



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACIA

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“DESARROLLO DE AGENTES
TERAPÉUTICOS CON ACCIÓN
FOTOTÓXICA”**

MARÍA NOEL URRUTIA

Córdoba, Octubre de 2015

Trabajo de Tesis para optar al grado de Doctora en Ciencias Químicas

DIRECTORA

Prof. Dra. CRISTINA ORTIZ

Departamento de Farmacia
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba

COMISIÓN EVALUADORA

Prof. Dra. CRISTINA MOTRÁN

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

Prof. Dra. MARÍA GABRIELA PARAJE

Cátedra de Microbiología
Departamento de Fisiología
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Universidad Nacional de Córdoba

Prof. Dr. JUAN ARGÜELLO

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

EVALUADOR EXTERNO

Prof. Dr. LUIS BRUNO-BLANCH

Departamento de Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de La Plata

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
OBJETIVOS	iii
ABREVIATURAS	v
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL	1
CAPÍTULO 2: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS FOTOSENSIBILIZADORES	43
CAPÍTULO 3: ESTUDIOS DE AGREGACIÓN	95
CAPÍTULO 4: PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y FOTOQUÍMICAS... ..	147
CAPÍTULO 5: INACTIVACIÓN FOTODINÁMICA.....	211
CONCLUSIONES GENERALES Y PROYECCIONES	253
ANEXOS	257
ANEXO 1: Caracterización de <i>Neutral Red</i>	263
ANEXO 2: Caracterización de <i>Neutral Red</i> monobromado	271
ANEXO 3: Caracterización de <i>Cresyl Violet</i>	281
ANEXO 4: Caracterización de <i>Cresyl Violet</i> tribromado	291
ANEXO 5: Caracterización de <i>Cresyl Red</i>	303
ANEXO 6: Caracterización de <i>Cresyl Red</i> tribromado.....	313
ANEXO 7: Cromatogramas.....	321
ANEXO 8: Medios empleados en Inactivación Fotodinámica.....	325
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS	331

RESUMEN

La Terapia Fotodinámica y la Inactivación Fotodinámica son tecnologías que emplean luz visible, oxígeno y compuestos Fotosensibilizadores para la destrucción celular. La Terapia Fotodinámica representa una modalidad terapéutica ampliamente estudiada, la cual fue originalmente desarrollada y aprobada para el tratamiento de una variedad de tumores sólidos. Por su parte, el desarrollo de resistencia a agentes antibacterianos y antifúngicos de uso en clínica, exige la investigación de estrategias alternativas. La Inactivación Fotodinámica surgió como una nueva modalidad de tratamiento para infecciones microbianas como consecuencia de su elevada eficiencia y menor potencial para el desarrollo de resistencia. La fotoactivación del Fotosensibilizador en el sitio de acción, con luz de longitud de onda específica, resulta en la destrucción celular por una compleja cascada de reacciones químicas, biológicas y fisiológicas que se producen con posterioridad a la formación de diversas especies reactivas de oxígeno.

A pesar de la extensa aplicación clínica, los Fotosensibilizadores empleados actualmente evidencian importantes efectos adversos. En consecuencia, el desarrollo de nuevos compuestos con mejores propiedades y especificidad adecuada para cada tipo de patología, contribuiría de manera fundamental en el avance de ambas metodologías terapéuticas.

Considerando las diversas propiedades que destacan a *Neutral Red* y *Cresyl Violet* como Fotosensibilizadores altamente interesantes, se desarrolló la derivatización mediante la halogenación, con el propósito de mejorar las propiedades fotoquímicas y aumentar el máximo de absorción.

Se abordó un estudio comparativo de las propiedades fisicoquímicas y fotoquímicas más relevantes de los precursores y los nuevos derivados, determinando coeficiente de partición, constante de disociación ácido-base, producción de oxígeno singlete, estabilidad química y fotoestabilidad. Un

estudio exhaustivo de agregación en función de la concentración de compuesto y en diferentes medios como *N,N*-dimetilformamida, dimetilsulfóxido, etanol, mezclas hidroalcohólicas, agua: polietilenglicol 400, agua, *buffer* pH 1,2; 5,8 y 7,4, permitió identificar inequívocamente las especies monoméricas y los agregados de orden superior.

Finalmente se abordaron los estudios de Inactivación Fotodinámica empleando *Neutral Red* y el nuevo derivado monobromado, el cual presentó óptimas propiedades como pureza, solubilidad y producción de oxígeno singlete. La evaluación frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* meticilino resistente 61, evidenció mayor muerte bacteriana producida por el nuevo compuesto bromado, en comparación con el precursor, en todas las condiciones ensayadas.

OBJETIVOS

Motivados por los recientes logros de la investigación en Terapia Fotodinámica y justificada por la severa amenaza que representa la resistencia a los antimicrobianos, la Inactivación Fotodinámica se ha introducido como un enfoque prometedor y revolucionario para destruir microorganismos patógenos. Numerosas investigaciones, han demostrado que es eficaz contra bacterias, virus, hongos, levaduras, parásitos y protozoos.

La Inactivación Fotodinámica se ha postulado como una modalidad antimicrobiana alternativa, la cual involucra la administración de un agente Fotosensibilizador, seguido por la irradiación con luz de una longitud de onda específica. Los compuestos Fotosensibilizadores son moléculas orgánicas que transforman la energía luminosa en energía química, ya que su activación con luz visible, en presencia de oxígeno molecular, ocasiona la formación de especies reactivas de oxígeno. Las mismas, en altas concentraciones pueden conducir a la muerte celular, debido a su elevada citotoxicidad.

A pesar de la extensa aplicación clínica de los Fotosensibilizadores aprobados por las Autoridades Regulatorias, los mismos presentan importantes efectos adversos. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas entidades químicas con mejores propiedades y especificidad adecuada para cada tipo de patología, contribuye de manera fundamental al avance de esta novedosa alternativa terapéutica.

Objetivo General

El Objetivo General de esta Tesis Doctoral es contribuir al desarrollo de la Fotomedicina, ciencia referida a la interacción de fármacos y luz, mediante la síntesis, caracterización y análisis de nuevos Agentes Fotosensibilizadores que podrían presentar mayor efectividad, menores efectos adversos y mejores propiedades que los líderes actuales, con especificidad adecuada y características interesantes para las diferentes aplicaciones biomédicas.

Objetivos Específicos

Los Objetivos Específicos se basan en diversas actividades vinculadas al desarrollo y evaluación de nuevas entidades químicas derivadas de las Familias de las Azinas y Oxazinas:

- ✓ Síntesis y caracterización de nuevos Agentes Fotosensibilizadores.
- ✓ Determinación de diversas propiedades fisicoquímicas de interés biológico y farmacéutico de los compuestos precursores y los nuevos derivados.
- ✓ Evaluación de la inactivación fotodinámica de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, mediada por los Fotosensibilizadores seleccionados.

HIPÓTESIS

Como Hipótesis de trabajo se propone que nuevos compuestos con mejores propiedades que los líderes actualmente en uso, permitan revertir las desventajas que éstos presentan, mejorando el tratamiento de diversas patologías y contribuyendo al desarrollo de las aplicaciones terapéuticas fotodinámicas.

ABREVIATURAS

Abs: Absorbancia.

Abs₀: Absorbancia a tiempo cero.

Abs_t: Absorbancia a tiempo *t*.

ADME: Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ALA: Ácido 5-aminolevulínico.

ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ATCC: *American Type Culture Collection.*

AZT: Zidovudina.

Blu-U®: *Blue Light Photodynamic Therapy Illuminator.*

CBM: Concentración Bactericida Mínima.

CDCl₃: Cloroformo deuterado.

CES: Cruce entre sistemas.

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima.

CIPYP: Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias.

clog P: Coeficiente de partición teórico.

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute.*

CONICET: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

COSY: *Correlation spectroscopy* (Experimento homonuclear ¹H-¹H).

CR: *Cresyl Red.*

CRBr: *Cresyl Red* monobromado.

CRBr₂: *Cresyl Red* dibromado.

CRBr₃: *Cresyl Red* tribromado.

CV: *Cresyl Violet.*

CVBr: *Cresyl Violet* monobromado.

CVBr₂: *Cresyl Violet* dibromado.

CVBr₃: *Cresyl Violet* tribromado.

DMA: 9,10-dimetilantraceno.

DMAO₂: 9,10-dimetilantraceno oxidado.

DMF: *N,N*-dimetilformamida.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DMSO-d₆: Dimetilsulfóxido deuterado.

D₂O: Agua deuterada.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético (*Ethylenediaminetetraacetic acid*).

EI-MS: Espectrometría de masa de impacto electrónico.

EPR: Espectroscopia de Resonancia Paramagnética Electrónica (*Electron Paramagnetic Resonance*).

ERO: Especies Reactivas de Oxígeno.

ESI-MS: Espectrometría de masa de ionización por electrospray.

ESI-MS/MS: Espectrometría de masa de ionización por electrospray en tándem.

ϵ : Coeficiente de extinción molar.

F: valor de la prueba de significancia de Fisher.

FDA: *Food and Drug Administration*.

FS: Fotosensibilizador.

⁰FS: Fotosensibilizador en estado fundamental.

¹FS*: Fotosensibilizador en estado singlete excitado.

³FS*: Fotosensibilizador en estado triplete excitado.

FT-IR: Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared*).

H-ALA: 5-aminolevulinato de hexilo.

HDL: Lipoproteínas de alta densidad (*High Density Lipoproteins*).

HMBC: *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (Experimento heteronuclear ¹H-¹³C).

Hp: Hematoporfirina.

HpD: Derivados de Hematoporfirina.

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (*High Performance Liquid Chromatography*).

HPPH: 2-devinilo-2-(1-hexiloxietilo) pirofeofórbido.

HSQC: *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (Experimento heteronuclear ^1H - ^{13}C).

IFD: Inactivación Fotodinámica.

IR: Espectroscopia Infrarroja.

k' : Factor de capacidad.

k_{obs} : Constante de velocidad observada.

LDL: Lipoproteínas de baja densidad (*Low Density Lipoproteins*).

LED: Diodo emisor de luz (*Light-Emitting Diode*).

log P_{HPLC} : Logaritmo del coeficiente de partición obtenido por HPLC.

log k_w : Extrapolación de la relación lineal de $\log k$ vs φ .

log $P_{O/w}$: Logaritmo del coeficiente de partición *n*-octanol-agua.

λ_E : Longitud de onda de máxima absorción experimental.

λ_{ex} : Longitud de onda de excitación.

$\lambda_{m\acute{a}x}$: Longitud de onda de máxima absorción.

λ_T : Longitud de onda de máxima absorción teórica.

MAL: 5-aminolevulinato de metilo.

MB: *Methylene Blue*.

Nd:YAG: Itrio-Aluminio dopado de Neodimio (*Neodymium: Yttrium-Aluminum-Garnet*).

NR: *Neutral Red*.

NRBr: *Neutral Red* monobromado.

NRBr₂: *Neutral Red* dibromado.

NRBr₃: *Neutral Red* tribromado.

NR(CH₃)₂: *Neutral Red* dimetilado.

NRI: *Neutral Red* monoyodado.

ν : Frecuencia.

$^1\text{O}_2$: Oxígeno singlete.

$^3\text{O}_2$: Oxígeno molecular en estado triplete fundamental.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

P: Coeficiente de partición *n*-octanol-agua.

PBS: *Buffer* fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*).

PEG: Polietilenglicol.

r²: Coeficiente de correlación.

R_f: Relación de frentes.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

RMN-¹H: Resonancia Magnética Nuclear de Protones.

RMN-¹³C: Resonancia Magnética Nuclear de Carbonos.

RP: Fase Reversa (*Reverse Phase*).

s: suma de cuadrados residual.

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA).

SOD: Superóxido dismutasa.

TEAP: Fosfato de Trietilamonio (*Triethylammonium Phosphate*).

TEMP: 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona.

TEMPO: 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona-*N*-oxil.

TFD: Terapia Fotodinámica.

TFDA: Terapia Fotodinámica Antimicrobiana.

TLC: Cromatografía en Capa Delgada (*Thin Layer Chromatography*).

t₀: Tiempo muerto.

t_R: Tiempo de retención.

UFC/mL: Unidades Formadoras de Colonias por mililitro.

φ: Fracción de volumen de solvente orgánico.

φ_Δ: Rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete.



CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN GENERAL



ÍNDICE CAPÍTULO 1

1.1- GENERALIDADES.....	5
1.2- ANTECEDENTES EN TERAPIA FOTODINÁMICA.....	7
1.3- FOTOSENSIBILIZADORES.....	8
1.3.1- Fotosensibilizadores de Primera Generación.....	11
1.3.2- Fotosensibilizadores de Segunda Generación	12
1.3.3- Fotosensibilizadores de Tercera Generación.....	14
1.3.4- Fotosensibilizadores Clínicos.....	16
1.4- MECANISMO DE ACCIÓN.....	16
1.5- RESPUESTA BIOLÓGICA.....	19
1.6- FUENTES DE LUZ	20
1.7- APLICACIONES DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA	23
1.7.1- Aplicaciones Oncológicas y Preoncológicas	23
1.7.1.1- Dermatología.....	23
1.7.1.2- Gastroenterología.....	25
1.7.1.3- Neurología	25
1.7.1.4- Neumonología	25
1.7.1.5- Otorrinolaringología	26
1.7.1.6- Urología	26
1.7.2 - Aplicaciones No Oncológicas	26
1.7.2.1- Dermatología.....	27

1.7.2.2- <i>Oftalmología</i>	28
1.7.2.3- <i>Ginecología</i>	28
1.7.2.4- <i>Inactivación Fotodinámica</i>	29
1.8- TRATAMIENTOS FOTODINÁMICOS EN ARGENTINA	30
1.8.1- Investigaciones en desarrollo	30
1.8.2- Fármacos aprobados	31
1.9- PRÁCTICA CLÍNICA DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA	32
1.10- BIBLIOGRAFÍA	34

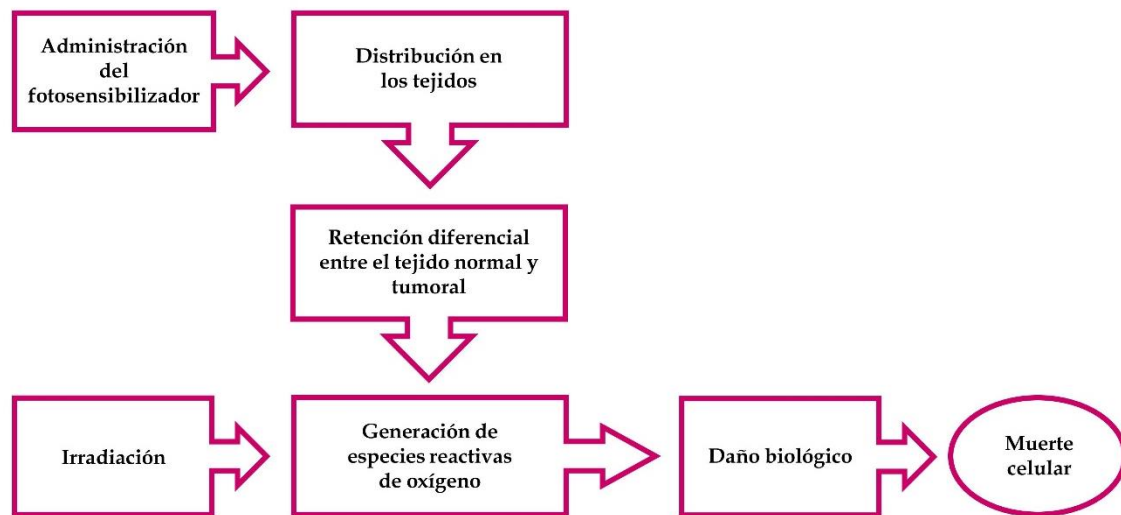
1.1- GENERALIDADES

La Terapia Fotodinámica (TFD) es una técnica simple y eficaz que ha experimentado un crecimiento vertiginoso, permitiendo emplearse en el tratamiento de diferentes tipos de patologías con resultados alentadores.^{1,2} Esta modalidad terapéutica consta de dos fases, la primera consiste en la fotosensibilización de las células anormales mediante la administración de compuestos fotosensibilizadores (FS). Los mismos, son moléculas orgánicas que se acumulan principalmente en los tejidos blanco y posibilitan la transformación de la energía luminosa en energía química.^{1,3-8} La fotosensibilización se desencadena administrando agentes exógenos por vía tópica, oral o endovenosa, o mediante la estimulación de la vía endógena aplicando precursores como el ácido 5-aminolevulínico (ALA) o sus derivados. Los compuestos precursores se incorporan principalmente a células en fase de proliferación y son transformados en protoporfirina IX, un efectivo FS.^{5,9-12} La segunda fase involucra la irradiación del área afectada con luz visible, empleando una longitud de onda específica dirigida al blanco terapéutico.^{1,4-8} Esta irradiación genera el estado excitado del FS que posteriormente transfiere la energía a moléculas del entorno, ocasionando la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales inducen daño tisular y destrucción selectiva de los tejidos.^{1,3-7,13} La acción combinada del FS y luz, en presencia de oxígeno molecular, genera un daño biológico irreversible en la zona tratada conduciendo a la muerte de las células blanco.^{3-5,13,14}

Esta alternativa terapéutica presenta una selectividad dual, ya que el fármaco se acumula preferentemente en el tejido anormal y sólo produce toxicidad luego de la irradiación del área afectada, conduciendo a un daño mínimo sobre las estructuras adyacentes sanas.^{6,7,14-16} La selectividad del tratamiento, se fundamenta en la mayor capacidad que presentan las células anormales para incorporar y concentrar la sustancia fotosensibilizante, presentando además menor velocidad de eliminación.^{4,7,16}

La TFD ha sido objeto de numerosas investigaciones y se desarrolló tradicionalmente como un tratamiento específico para patologías cancerosas.^{3,4,17}

Las ventajas que presenta esta modalidad terapéutica en comparación con los tratamientos convencionales son baja toxicidad sistémica, potencial aplicación en combinación con quimioterapia, cirugía o radioterapia y selectividad para dañar exclusivamente el tejido anormal, sin inducir graves efectos secundarios en el organismo, ya que sólo en el área tumoral irradiada se reúnen los tres agentes responsables del efecto fotodinámico: FS, luz y oxígeno^{4-6,18} (**Esquema 1.1**).



Esquema 1.1: Diagrama general de la Terapia Fotodinámica.

La TFD es efectiva para el tratamiento de lesiones cutáneas superficiales preoncológicas, oncológicas y no oncológicas, en casos en los cuales el tamaño, sitio y número de lesiones limitan la eficacia o aceptabilidad de las terapias convencionales.¹⁹ Se caracteriza por ser un procedimiento especialmente apropiado para pacientes que presentan contraindicaciones quirúrgicas, diversas enfermedades asociadas o múltiples tumores, dado que permite un tratamiento menos agresivo y con mínimos efectos adversos.^{5,18}

Entre las principales ventajas que presenta la TFD, cabe mencionar que es una terapia:^{10,14,18-20}

- ✓ Selectiva.
- ✓ No invasiva.

- ✓ Relativamente segura.
- ✓ Ambulatoria.
- ✓ Mínima o nula cicatriz.
- ✓ Posibilita tratar múltiples lesiones de manera simultánea.
- ✓ Bajo riesgo.
- ✓ Relativamente libre de dolor.
- ✓ Mínimos efectos secundarios.
- ✓ Ausencia de anestesia.
- ✓ Permite repetir el tratamiento.

Las reacciones adversas locales más frecuentes asociadas a la TFD son disfagia y dolor transitorio, mientras que los efectos sistémicos más relevantes son fiebre, náuseas y fotosensibilidad.^{5,16,17,21}

En la actualidad, la TFD presenta diversas aplicaciones oncológicas y no oncológicas, siendo recientemente investigada como una terapia antimicrobiana para el tratamiento de infecciones localizadas.^{13,22,23}

1.2- ANTECEDENTES EN TERAPIA FOTODINÁMICA

El abordaje de ciertas patologías mediante la aplicación de luz se conoce desde la antigüedad. Tres mil años antes de la era moderna, las antiguas culturas de Egipto, China, India y Grecia trataban el raquitismo con baños de sol. Estas prácticas son consideradas fototerapias, ya que combinan la acción de la luz sobre el cuerpo del paciente sin la administración de un fármaco FS exógeno.^{6,24}

Estas técnicas evolucionaron en India y Egipto en el siglo XIV a.C., con la administración de extractos vegetales que contenían psoralenos a pacientes con psoriasis y vitiligo, en combinación con la exposición a luz solar. Dichas técnicas son conocidas como fotoquimioterapia, ya que los resultados terapéuticos se obtienen mediante la absorción de luz por un FS exógeno.^{6,24,25}

En el año 1900, Oscar Raab reportó que el compuesto *Acridine Orange* (Familia de las Acridinas) en presencia de luz solar, es letal para el protozoo *Paramecium*

caudatum; en tanto que en 1904 Herman von Tappeiner, combinó una solución tópica de *Eosin* al 5% (Familia de los Xantenos) con luz para tratar tumores cutáneos, condilomas y lupus cutáneo.^{16,17,19,24-27}

A partir de 1950 se inició la preparación de compuestos derivados de Hematoporfirinas (Hp) y se reportó su afinidad por los tejidos neoplásicos.^{24,25} En el año 1960, Richard Lipson y Samuel Schwarz demostraron la localización del agente Hp en tejidos tumorales. Ivan Diamond en el año 1972, reportó la fototoxicidad de la Hp al producir la destrucción de tejidos tumorales, con posterioridad a la irradiación con luz blanca en modelos animales con cáncer.^{19,24} Además, Kenneth Weishaupt demostró la producción de oxígeno singlete (1O_2), una especie altamente reactiva, luego de la absorción de energía lumínica por la Hp.¹⁹ A partir de entonces, se iniciaron múltiples estudios en TFD en Estados Unidos, Japón y diversos países de Europa.^{25,26}

Thomas Daugherty presentó en el año 1978, los primeros estudios clínicos controlados en seres humanos, relativos a la aplicación de esta novedosa terapia para el tratamiento de tumores cutáneos administrando Hp por vía endovenosa como sustancia fotosensibilizante.^{19,25,27}

La TFD fue aprobada por la *Food and Drug Administration* (FDA, Estados Unidos) en el año 1995 para el tratamiento de carcinomas obstructivos de esófago y desde 1998 se aplica en lesiones bronquiales incipientes. Son numerosos los países que la han aprobado para el tratamiento de cáncer de pulmón, esófago, vejiga y otras patologías como degeneración macular asociada a la edad.^{25,26}

Actualmente se acepta la aplicación de la TFD para el tratamiento del carcinoma basocelular superficial, enfermedad de Bowen (carcinoma escamoso *in situ*) y queratosis actínicas.²¹

1.3- FOTOSENSIBILIZADORES

Los FS son compuestos químicos capaces de absorber luz de una determinada longitud de onda y transformarla en energía, que en el contexto de la TFD, implica la producción de agentes citotóxicos letales.²⁸ El agente FS es considerado

un componente crítico en estos procedimientos, debiendo presentar características claves como la localización en el sitio de acción fotodinámico, absorción de luz de una longitud de onda apropiada y la generación de especies citotóxicas, lo que conduce a la respuesta biológica deseada.^{12,26}

Cientos de compuestos altamente coloreados de origen natural y sintético, pueden actuar como FS, sin embargo, un FS ideal debe presentar las siguientes características:^{3,6,8,12,14,18,19,26-29}

- ✓ Ser químicamente puro, de composición constante y conocida.
- ✓ Elevado coeficiente de extinción molar (ϵ) entre 600 - 800 nm (intervalo de máxima penetración de la luz en el tejido y niveles energéticos capaces de producir $^1\text{O}_2$).
- ✓ Mínima citotoxicidad en oscuridad y elevada fototoxicidad.
- ✓ Alta reactividad fotoquímica y capacidad para producir $^1\text{O}_2$ y otras ERO.
- ✓ Alta estabilidad química y fotoquímica.
- ✓ Bajas dosis lumínicas para su activación, lo que reduce el tiempo de irradiación.
- ✓ Mínima tendencia a la agregación.
- ✓ Localización y retención selectiva en las células blanco.
- ✓ Penetración profunda y distribución homogénea en el tejido diana.
- ✓ Limitada retención en el tejido normal, lo que induce una baja toxicidad sistémica.
- ✓ Elevada solubilidad en fluidos biológicos.
- ✓ Adecuada lipofilidad que permita la difusión a través de membranas biológicas.

Las propiedades fisicoquímicas de los FS son relevantes en la eficacia de la fotosensibilización. El requisito fundamental para una respuesta óptima, es una cantidad suficiente de fármaco localizado en el tejido diana. Inicialmente, los compuestos FS ingresan a las células normales y a las hiperproliferativas, sin embargo, permanecen mayor tiempo en estas últimas. Los mecanismos que permiten esta prolongada retención selectiva aún no se comprenden en

profundidad. El incremento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos y el limitado drenaje linfático en los tejidos neoplásicos son factores que podrían contribuir a la retención selectiva del fármaco en las lesiones tumorales.^{8,28} La localización y biodistribución se encuentran determinadas tanto por las características propias del FS (lipofilicidad, distribución de carga, pK_a , tendencia a la agregación y peso molecular), como por aquellas atribuibles a los tejidos neoplásicos (sistema vascular, drenaje linfático, presencia de macrófagos).^{6,28}

En general, los FS lipofílicos se unen fuertemente a lipoproteínas distribuidas en el sistema sanguíneo, tanto a las denominadas de alta densidad (HDL) como a las de baja densidad (LDL), siendo transportados principalmente al tejido neoplásico. El incremento del carácter lipofílico del agente FS conduce a un aumento en la selectividad tumoral, lo cual está relacionado con la elevada expresión de receptores LDL en la membrana de las células neoplásicas. En el interior celular, las moléculas FS se acumulan principalmente en compartimentos lipofílicos, incluyendo mitocondrias, retículo endoplasmático y membranas lisosomales.^{8,28,29}

Por su parte, los FS hidrofílicos son transportados por diversas proteínas del suero, destacándose entre ellas la albúmina. Los mismos, se acumulan selectivamente en el espacio intersticial y el estroma vascular del tejido tumoral, evidenciando una mínima tendencia a difundir a través de la membrana plasmática hacia el citoplasma.^{8,29}

Considerando que el sitio de localización primaria del FS depende fuertemente del carácter lipofílico, en general se acepta que los fármacos con elevada lipofilicidad producen la muerte de las células tumorales mediante interacciones directas. En contraste, los FS hidrosolubles causan la muerte de las células hiperproliferativas de manera indirecta al dañar los vasos sanguíneos, lo que reduce el suministro de oxígeno y nutrientes esenciales. En general, los agentes FS no se acumulan en los núcleos celulares, así, la fotosensibilización presenta un bajo potencial para causar daño en el ADN, mutaciones y carcinogénesis.⁸

El desarrollo de nuevas moléculas FS con especificidad adecuada para cada tipo de patología constituye una parte integral del avance constante de la TFD.⁶

1.3.1- Fotosensibilizadores de Primera Generación

La primera generación de FS para uso clínico en TFD la constituyen los derivados de Hp (**Figura 1.1**) de administración endovenosa, los cuales correspondían a una combinación compleja de oligómeros de éteres y ésteres.^{12,14,30} Actualmente, se comercializa un fármaco que presenta mayor grado de pureza, denominado Photofrin[®].^{6,7,12}

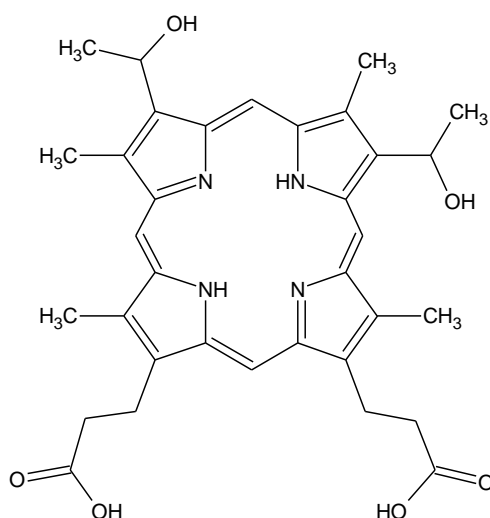


Figura 1.1: Estructura química de Hematoporfirina.

Los primeros derivados de Hp se obtuvieron mediante la reacción de Hp en una combinación de ácido acético y sulfúrico, que condujo a la formación de una mezcla compleja de dímeros y oligómeros. La purificación parcial de los oligómeros más activos empleando métodos cromatográficos permitió obtener Photofrin[®].²⁹

Sin embargo, Photofrin[®] no es un FS ideal para TFD ya que presenta serios inconvenientes, considerando que es una mezcla compleja de porfirinas que contiene aproximadamente 80% de componentes activos y 20% de componentes inactivos.^{12,14} El espectro de absorción presenta una banda principal cercana a 400 nm y bandas superiores a 600 nm muy poco intensas, destacando que para

longitudes de onda menores a 600 nm la penetración de la luz en los tejidos es muy limitada, como consecuencia de la presencia de cromóforos endógenos y la dispersión de la radiación. Además, la acumulación del fármaco en la piel provoca una elevada fotosensibilidad cutánea, lo que requiere evitar la luz de 4-6 semanas posteriores a la fotosensibilización.^{6-8,12,14,28,29}

Photofrin[®] se aprobó en el año 1993 para el tratamiento de cáncer de vejiga en Canadá, mientras que la FDA lo aprobó para el tratamiento de cáncer de esófago superficial y avanzado en 1995, cáncer de pulmón en etapas temprana y tardía en 1998 y esófago de Barrett en el año 2003.^{12,29} En diversos países, Photofrin[®] se emplea actualmente en el tratamiento de cáncer gástrico superficial en fase inicial, cáncer de cuello uterino y displasia cervical, una afección precancerosa.^{12,25,29}

Otros tipos de derivados de Hp son Photogem[®] y Photosan-3[®], que al igual que Photofrin[®], consisten en una mezcla de monómeros, dímeros y oligómeros. Se ha reportado que Photogem[®] presenta propiedades fotofísicas idénticas a Photofrin[®] y las mismas características terapéuticas y de diagnóstico.³¹ Este producto se aprobó para su empleo en aplicaciones clínicas en el año 1998 en Rusia y posteriormente en Brasil, mientras que Photosan-3[®] está aprobado en la Unión Europea.^{29,31}

1.3.2- Fotosensibilizadores de Segunda Generación

La segunda generación de FS surgió ante la necesidad de desarrollar compuestos que presenten una absorción lumínica superior a 630 nm, posibilitando la penetración tisular, un efecto fotodinámico más profundo y una mayor velocidad de eliminación de los tejidos.^{32,33} Estos nuevos FS se caracterizan por ser compuestos puros, apropiadamente identificados y eficaces generadores de ¹O₂ y otras ERO.^{32,34,35} Además, la elevada selectividad que presentan por los tejidos tumorales y la rápida eliminación del organismo, conducen a una disminución de los efectos adversos asociados con la terapia.³⁵

A pesar de sus éxitos aparentes, los derivados de Hp presentan desventajas muy importantes. Si bien, tales inconvenientes no han imposibilitado la aplicación de Photofrin® como una valiosa herramienta frente a diversos tipos de tumores y otras patologías, la búsqueda de nuevos FS continúa siendo un objetivo de gran relevancia.⁷

Con la finalidad de superar las deficiencias de Photofrin®, se ha desarrollado un gran número de FS de segunda generación, destacando la importancia del ALA y su derivado 5-aminolevulinato de metilo (MAL) (**Figura 1.2**). Ambos compuestos son prodrogas que actúan como precursores en la vía biosintética del hemo, dando origen a la protoporfirina. Ésta se acumula en los tejidos tumorales e inflamatorios y se metaboliza a un derivado fotodinámicamente inactivo, en un período más corto que los FS de primera generación, conduciendo a una menor fotosensibilidad cutánea, posterior al tratamiento.^{5,9,10,12,14,21} En el año 1999 la FDA aprobó el ALA como el primer FS tópico, mientras que en el año 2004 se aprobó el derivado MAL.^{19,29}

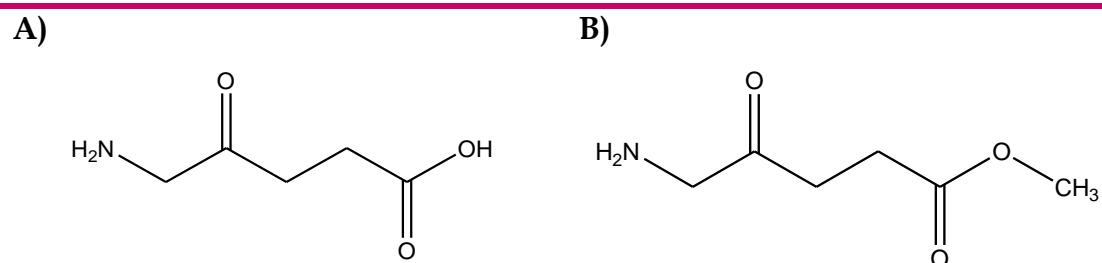


Figura 1.2: Compuestos fotosensibilizadores de segunda generación. **A)** Ácido 5-aminolevulínico (ALA); **B)** 5-aminolevulinato de metilo (MAL).

Cabe señalar que otros importantes agentes FS de segunda generación son los pertenecientes a las Familias de las Tiazinas (*Methylene Blue*), Porphirinas (Verteoporfirina), Ftalocianinas, Naftalocianinas, Clorinas, Xantenos y Rodaminas.^{25,28,29,35}

1.3.3- Fotosensibilizadores de Tercera Generación

La mayoría de los FS de segunda generación son compuestos lipofílicos, lo que limita su solubilidad en medios acuosos impidiendo la administración endovenosa. Por esto, surge la necesidad de desarrollar sistemas de administración adecuados tales como liposomas, micelas o partículas poliméricas que aumenten la captación específica del FS por el tejido blanco. Estos sistemas reducen los efectos adversos en las células normales y conducen a un incremento en la eficacia de la TFD ^{5,35-39} (Figura 1.3).

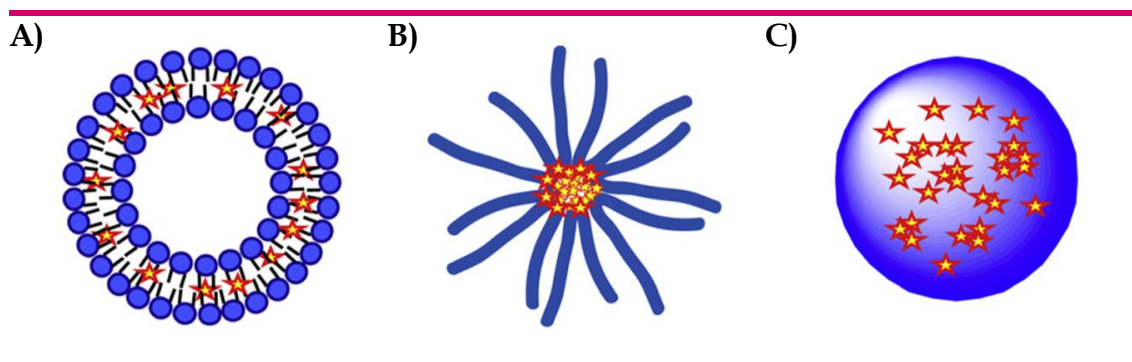


Figura 1.3: Ilustración esquemática de diversos sistemas de administración aplicables en Terapia Fotodinámica. Compuesto fotosensibilizador = ★ . A) Liposomas; B) Micelas; C) Nanopartículas sólidas.

Es importante destacar que estos vehículos proporcionan un entorno adecuado que permite administrar el fármaco en su forma monomérica, ya que numerosos agentes FS se agregan en medios acuosos como consecuencia de que el esqueleto molecular hidrofóbico tiende a evitar el contacto con las moléculas de agua.^{5,37} Esta situación, puede dificultar la eficacia del fármaco *in vivo* como consecuencia de la disminución de su biodisponibilidad y limitar su capacidad de absorción lumínica.^{5,32,33,35-37,39}

El sistema ideal de administración de un fármaco debería permitir la acumulación selectiva del FS en el tejido tumoral y la liberación del mismo en el sitio diana, con limitada absorción por las células normales. Además, el vehículo

debe ser capaz de incorporar al FS sin pérdida o alteración de su actividad, ser biodegradable y no generar inmunogenicidad.^{3,35,36}

A diferencia de los sistemas típicos de administración de fármacos, estos vehículos pueden no liberar las moléculas de FS, siendo esencial que las ERO, los agentes terapéuticos reales, puedan difundir a través de la matriz para ejercer la eficacia terapéutica por fotosensibilización.³⁶

Uno de los principales objetivos de los investigadores es incrementar la localización selectiva del FS, aumentando el potencial de la TFD, empleando para ello las características específicas de las células tumorales, como la presencia de determinados antígenos o receptores. Una estrategia consiste en la unión de diversos ligandos tales como péptidos, aptámeros, ácido hialurónico y folatos a la nanopartícula que contiene las moléculas de FS ^{28,37} (Figura 1.4).

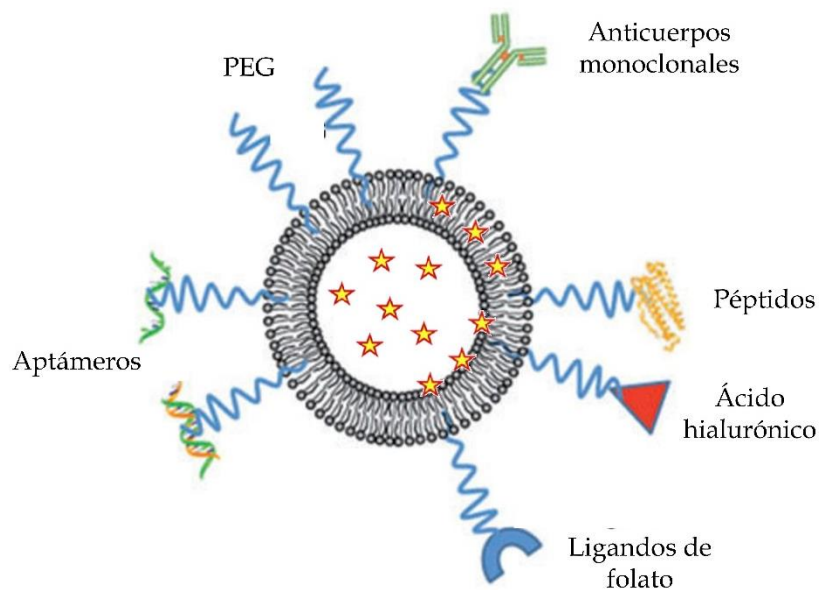


Figura 1.4: Ilustración esquemática de nanopartículas dirigidas hacia células tumorales mediante modificaciones superficiales tales como anticuerpos, péptidos, aptámeros, ácido hialurónico y ligandos de folato, unidos frecuentemente por cadenas de polietilenglicol (PEG). Compuesto fotosensibilizador = ★.

En particular, la fotoimmunoterapia es una metodología terapéutica actualmente en desarrollo, que emplea anticuerpos monoclonales antitumorales como medio de transporte del FS. Los anticuerpos se unen a antígenos tumorales, demostrado resultados prometedores al dirigir los FS de manera eficaz al objetivo terapéutico. Esta técnica permite emplear una gran diversidad de FS, incluso aquellos que no son retenidos principalmente en el tejido tumoral, ofreciendo una serie de ventajas como la reducción de la dosis y una mínima o nula fotosensibilidad cutánea.^{6,35,37}

El desarrollo de transportadores de tamaño nanométrico es un enfoque novedoso que permite mejorar la eficiencia de la actividad fotodinámica, superando numerosos efectos adversos asociados a la TFD clásica.^{3,5,39}

1.3.4- Fotosensibilizadores Clínicos

Numerosos compuestos químicos pueden comportarse como FS y se desarrollan nuevos con regularidad. Sin embargo, un número reducido se ha empleado en ensayos clínicos y son limitados los que se encuentran fácilmente disponibles en el mercado. En la **Tabla 1.1** se presentan los FS clínicos actuales y su fabricante de origen.^{12,27,38,40}

Un gran número de los FS clínicos aprobados actualmente pertenecen a la Familia de las Porphirinas, desarrolladas tradicionalmente en la década de 1970 y principios de 1980.⁴⁰

1.4- MECANISMO DE ACCIÓN

El paso inicial del mecanismo de fotosensibilización es la absorción de un fotón de luz por el FS, el cual se excita desde el estado fundamental (^0FS) al primer estado singlete excitado ($^1\text{FS}^*$), el cual es extremadamente inestable con una vida media entre 10^{-6} a 10^{-9} segundos^{13,17,29} (**Esquema 1.2**). El $^1\text{FS}^*$ puede retornar al estado ^0FS mediante la emisión de fluorescencia, o bien alcanzar el estado triplete

excitado ($^3\text{FS}^*$) con una vida media más extensa, de aproximadamente 10^{-3} segundos, mediante un cruce entre sistemas (CES)^{13,17,29} (**Sección 4.4.1.1: “Procesos Fotofísicos”**). La destrucción tumoral es más eficiente cuando se emplean compuestos con extensa vida media y alto rendimiento cuántico del estado $^3\text{FS}^*$. Esto se sustenta en que el mayor tiempo de vida, en comparación con el estado $^1\text{FS}^*$, permite la interacción con moléculas circundantes y posterior generación de las especies citotóxicas.^{8,26}

Tabla 1.1: Fotosensibilizadores clínicos actualmente aprobados por Autoridades Regulatorias.

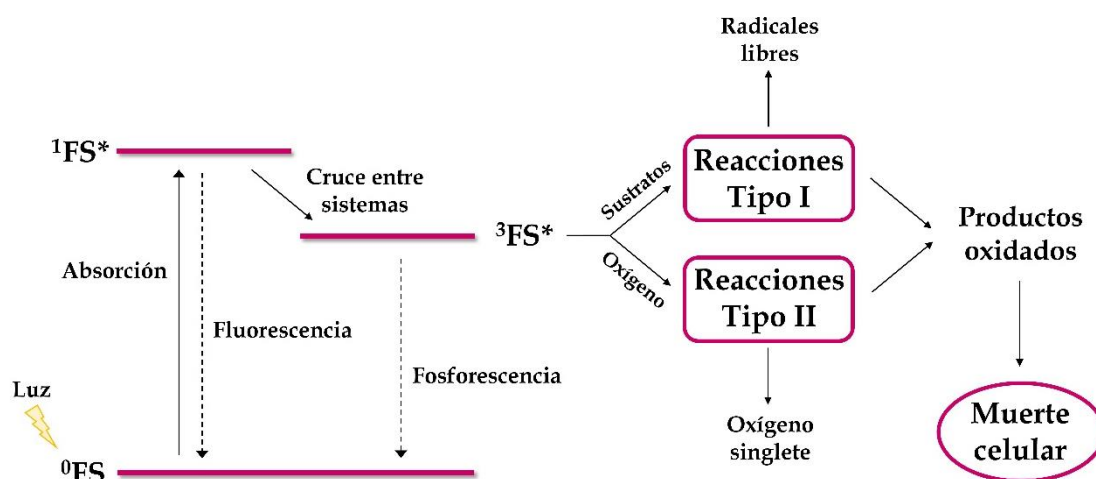
Producto	Fármaco	Fabricante	Sitio Web
Photofrin®	HpD ^a	Axcan Pharma, Inc.	www.axcan.com
Levulan®	ALA ^b	DUSA Pharmaceuticals, Inc.	www.dusapharma.com
Metvix®	MAL ^c	PhotoCure ASA	www.photocure.com
Hexvix®	H-ALA ^d	PhotoCure ASA	www.photocure.com
Visudyne®	Verteporfin	Novartis Pharmaceuticals	www.visudyne.com
Antrin®	Lutexaphyrin	Pharmacylics	www.pharmacylics.com
Foscan®	Temoporfin	Biolitec Pharma Ltd.	www.biolitecpharma.com
LS11	Talaporfin	Light Science	www.lightsciences.com
Photochlor	HPPH ^e	RPCI	www.roswellpark.org
Photosens®	Ftalocianina	General Physics Institute	www.gpi.ru

^aDerivados de Hematoporfirina; ^bÁcido 5-aminolevulínico; ^c5-aminolevulinato de metilo; ^d5-aminolevulinato de hexilo; ^e2-devinilo-2-(1-hexiloxietilo) pirofeofórbido.

La interacción del estado $^3\text{FS}^*$ con las moléculas del entorno conduce a dos tipos de reacciones fotooxidativas, definidas como mecanismos Tipo I y Tipo II.^{12,37}

El mecanismo Tipo I implica la abstracción de un átomo de hidrógeno o bien reacciones de transferencia de electrones entre el estado excitado del FS y un sustrato que puede ser biológico, el solvente u otra molécula FS, para producir iones radicales y radicales libres (**Esquema 1.2**). Estos radicales libres son

altamente reactivos y pueden interactuar con el oxígeno molecular para generar ERO, tales como aniones superóxido o radicales hidroxilo, los cuales en concentraciones elevadas, producen un deterioro biológico irreparable. Estas reacciones conducen a daños oxidativos que finalmente se expresan como lesiones biológicas.^{6,8,12,13,26,29,37}



Esquema 1.2: Diagrama de Jablonski modificado. Reacciones fotofísicas y fotoquímicas implicadas en los procesos fotodinámicos.

El mecanismo Tipo II es consecuencia de una transferencia de energía del estado $^3\text{FS}^*$ al oxígeno molecular en estado fundamental, generando el primer estado excitado del oxígeno, el $^1\text{O}_2$ (**Esquema 1.2**). Esta especie es extremadamente reactiva y puede interactuar con numerosos sustratos biológicos, induciendo daño oxidativo y en última instancia la muerte celular.^{12,13,16,29} En general, los procesos Tipo II predominan durante la TFD, siendo el $^1\text{O}_2$ la principal especie citotóxica responsable de los efectos biológicos observados, en tanto que las reacciones Tipo I presentan mayor relevancia a bajas concentraciones de oxígeno o en medios más polares (**Sección 4.4.1.2: "Procesos Fotoquímicos"**).^{6,8,13,17,26,37}

Las reacciones Tipo I y Tipo II conducen a un daño oxidativo en el interior de la célula diana produciendo la destrucción tumoral.¹³ Las especies citotóxicas

generadas a partir de ambos mecanismos son altamente reactivas, por lo que causan un daño muy localizado.^{14,17} Considerando que durante la TFD sólo se irradia el área afectada y que las especies citotóxicas generadas presentan un tiempo de vida acotado, el daño biológico se limita a las células tumorales.^{6,14,17,26}

1.5- RESPUESTA BIOLÓGICA

Es ampliamente conocido que la TFD induce la producción de agentes citotóxicos que destruyen con facilidad las células neoplásicas, sin embargo, esta respuesta *in vivo* es afectada por la complejidad de los sistemas biológicos. Numerosas estructuras subcelulares están involucradas durante el desarrollo de la TFD, entre las que cabe mencionar mitocondrias, lisosomas, membrana plasmática y núcleo, conduciendo a la muerte celular por necrosis o por apoptosis.^{1,41-44} El grado de destrucción tumoral depende de las propiedades del FS aplicado y la dosis de luz empleada, sin embargo, considerando los efectos biológicos implicados en la muerte celular es factible seleccionar el FS ideal para el tratamiento de una determinada patología.^{43,45}

La distribución del FS entre los componentes del plasma, impacta en la biodistribución en los diferentes tejidos y en consecuencia son dos los mecanismos de destrucción tumoral que se desencadenan mediante TFD:^{6,8,43}

✓ *Inducción indirecta de muerte celular:* ocasionada por el daño a la vasculatura tumoral. Los FS hidrofílicos se unen principalmente a albúmina y globulina, situándose en el estroma vascular y produciendo la muerte celular de manera indirecta, debido al daño causado en los vasos sanguíneos y a la consecuente disminución tanto de la concentración de oxígeno, como de diversos nutrientes.^{6,8,43,44}

✓ *Inducción directa de muerte celular:* Los FS con mayor afinidad por las lipoproteínas de baja densidad se incorporan al interior celular localizándose principalmente en mitocondrias, lisosomas y membrana plasmática. El efecto

fotodinámico conduce a un daño celular o pérdida de la viabilidad afectando a un gran número de componentes celulares. La fotoperoxidación de los ácidos grasos insaturados presentes en las membranas celulares, produce cambios en la permeabilidad y pérdida de fluidez en tanto que las reacciones secundarias de residuos fotooxidados pueden formar enlaces cruzados entre proteínas, lípidos y ADN. Estas reacciones oxidativas comprometen fuertemente las funciones celulares, ocasionando la muerte.^{1,6,43,44}

La erradicación exitosa del tejido maligno requiere dosis adecuadas del FS y luz fotoactivadora, siendo importante destacar que la penetración de la luz en los tejidos depende de las características de éste y de la longitud de onda de la radiación aplicada.^{1,8,37,45} En numerosas situaciones, ambos mecanismos de destrucción tumoral contribuyen a la muerte de las células anormales.^{1,6,44}

1.6- FUENTES DE LUZ

Entre las fuentes de irradiación que se emplean en la clínica para TFD, cabe destacar los láseres, los cuales proporcionan una selección exacta de la longitud de onda y la aplicación precisa de la radiación.^{1,8,19,46} Los mismos, emiten luz monocromática alcanzando la máxima efectividad, al minimizar el tiempo de exposición como consecuencia de la irradiación intensa y además permiten tratar áreas muy pequeñas. Es importante destacar, que estas fuentes de luz acopladas a dispositivos de fibra óptica posibilitan el tratamiento de neoplasias internas.^{19,28,46}

Las únicas opciones disponibles para proporcionar luz láser eran equipos de láser de argón-colorante y el de cobre-colorante, los cuales son costosos, de gran tamaño y no son fácilmente transportables. Sin embargo, recientemente ha surgido una nueva generación de equipamiento conocido como láseres de diodo, los cuales son pequeños, muy estables y de costos accesibles.^{7,28,46} Los láseres de estado sólido sintonizables constituyen el desarrollo más reciente, siendo particularmente útiles para la aplicación en TFD. Estos sistemas son portátiles,

durables y presentan un diseño compacto, destacándose el láser de granate de itrio-aluminio dopado de neodimio (*Neodymium: Yttrium-Aluminum-Garnet*, Nd:YAG)^{8,28,46} (Figura 1.5).

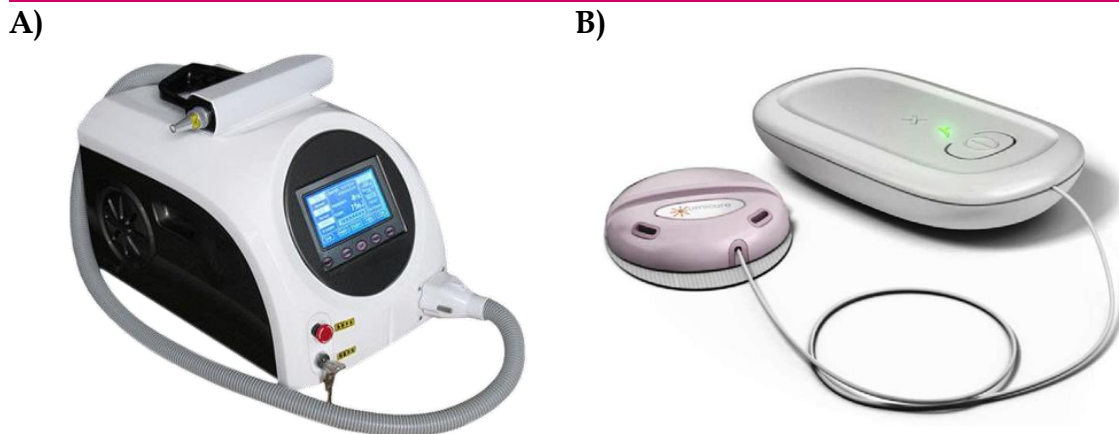


Figura 1.5: Fuentes de irradiación empleadas en la clínica para TFD. **A)** Equipo láser de Nd:YAG modelo CML 202; **B)** Fuente de luz LED con batería.

En TFD también son aplicables fuentes de luz no coherentes (no láser o policromáticas), principalmente en aquellos casos que no requieren el uso de fibras estrechas, como por ejemplo, el tratamiento de áreas extensas de profundidad escasa en queratosis actínicas.^{7,19} La principal desventaja que presentan es que la irradiación emitida no es uniforme y en consecuencia la dosimetría es menos precisa, siendo estas fuentes de radiación las más económicas.¹⁹ Considerando que un gran número de FS evidencian amplias bandas de absorción, las lámparas no coherentes permiten irradiar con múltiples longitudes de onda, conduciendo a una mejora en la eficacia de la terapia.^{7,19} Las fuentes de luz no láser se clasifican en diferentes categorías, todas ellas con un amplio espectro de longitudes de onda:^{19,45}

- ✓ Lámparas incandescentes.

- ✓ Lámparas de arco de alta presión.
- ✓ Lámparas de arco de baja presión.
- ✓ Diodos de luz.

Las lámparas incandescentes presentan un espectro continuo y emiten en un amplio intervalo del espectro visible al infrarrojo. Las lámparas de arco conducen electricidad a altas temperaturas y están conformadas por mercurio o xenón las de alta presión y material fluorescente las de baja presión.^{19,21,45,46} Además, existen dispositivos en estado sólido como los diodos emisores de luz (*Light-Emitting Diode*, LED) que presentan un intervalo estrecho de longitudes de onda (20 a 50 nm), son portátiles, apropiados para el tratamiento de áreas extensas y requieren voltajes pequeños^{1,21,28,45,46} (**Figura 1.5**). Las fuentes de luz no coherente autorizadas por la FDA son Blu-U® (*Blue Light Photodynamic Therapy Illuminator*) y ClearLight System®, indicadas principalmente para el tratamiento de diversas patologías dermatológicas^{16,19} (**Figura 1.6**).

A)



B)



Figura 1.6: Fuentes de luz no coherente autorizadas por la *Food and Drug Administration*. **A)** Blu-U®, **B)** ClearLight System®.

La ventaja primaria de una fuente de luz láser en TFD reside en su capacidad para producir un haz estrecho de luz, el cual puede ser eficazmente dirigido a través de la fibra óptica.^{7,19,28} Es importante destacar, que el desarrollo de láseres equipados mediante fibras ópticas revolucionó la fotosensibilización, ampliando su aplicabilidad en medicina, al permitir el empleo endoscópico de la radiación.^{8,28} Sin embargo, en aplicaciones que no requieren el empleo de fibras ópticas, las fuentes no láser son más apropiadas ya que producen grandes haces de luz. Numerosos investigadores coinciden en señalar que las fuentes de luz no láser son más prácticas, económicas y efectivas.^{7,19,21,46}

1.7- APLICACIONES DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA

Las indicaciones terapéuticas de la TFD son específicas y propias de cada una de las diversas áreas de la medicina. Actualmente, son numerosas las especialidades médicas que emplean la TFD en su arsenal terapéutico, destacando que el mayor número de aplicaciones se centra principalmente en el campo de la dermatología.^{6,7}

1.7.1- Aplicaciones Oncológicas y Preoncológicas

Tradicionalmente la TFD se empleó para el tratamiento de diferentes tipos de cánceres y patologías precancerosas, entre las cuales se destacan:

1.7.1.1- Dermatología

✓ *Carcinoma basocelular superficial y nodular:* En los últimos años la TFD empleó para su tratamiento el ALA y el MAL, los cuales presentan una eficacia terapéutica comparable y proporcionan excelentes resultados clínicos y cosméticos, equiparables a los obtenidos luego de una intervención quirúrgica.

La eficacia de la TFD es similar a la reportada empleando criocirugía*, con excelentes resultados cosméticos a corto y largo plazo. La TFD demostró ser una alternativa terapéutica aplicable en los casos en que los tratamientos convencionales son inapropiados o difíciles de implementar.^{16,21,47}

✓ *Carcinoma epidermoide y enfermedad de Bowen:* La TFD representa una opción adecuada para el tratamiento de estas patologías, ya que produce la muerte de las células tumorales en forma selectiva como consecuencia de que los compuestos ALA y MAL presentan una elevada afinidad celular, evidenciando escasos efectos adversos y un excelente resultado estético. El tratamiento se puede repetir en pacientes que presentan múltiples lesiones en áreas donde la cicatrización es dificultosa o la aplicación de alternativas terapéuticas convencionales es limitada.^{21,47,48}

✓ *Enfermedad de Paget:* La patología tratada con TFD empleando ALA tópico, responde de manera adecuada evidenciando resultados prometedores. No obstante, es factible la combinación con intervenciones quirúrgicas para el tratamiento de pacientes en estadios avanzados.⁴⁹

✓ *Queilitis actínica:* El tratamiento con TFD empleando ALA y MAL permitió revertir la patología con excelentes resultados cosméticos. Los efectos adversos reportados son ardor, sensación de quemadura y eritema durante la irradiación, los cuáles disminuyen al finalizar el período de iluminación. El seguimiento de los pacientes no reveló datos de recidiva.^{47,50}

*Método convencional empleado para el tratamiento de diversas patologías oncológicas y no oncológicas, principalmente cutáneas, mediante la aplicación de frío extremo para destruir el tejido anormal.

✓ *Queratosis actínicas*: Numerosos estudios clínicos han demostrado que la TFD empleando ALA es un tratamiento efectivo para queratosis actínicas no hipertróficas de rostro y cuero cabelludo, evidenciando buen grado de tolerancia. El compuesto MAL reveló mayor especificidad y selectividad sobre el tejido lesionado, con una menor incidencia de reacciones fototóxicas y dolor durante la fotosensibilización. La aplicación de sesiones de MAL-TFD se asocia con una mejor respuesta a largo plazo en comparación con otros tratamientos específicos, como criocirugía o láser.^{12,16,21,47,48}

1.7.1.2- Gastroenterología

La TFD se empleó inicialmente en el tratamiento de cáncer esofágico y luego en patologías del tracto gastrointestinal, como esófago de Barrett, adenocarcinoma gástrico y duodenal en estadios tempranos y tumores hepatobiliares y colorrectales. La TFD puede ser aplicada como coadyuvante de la quimioterapia y radioterapia en el abordaje de adenocarcinoma y cáncer de células escamosas de esófago. En estos procedimientos, la radiación láser se realiza mediante el empleo de un endoscopio.^{7,25,51}

1.7.1.3- Neurología

El empleo de ALA administrado vía oral, demostró alta eficacia en el tratamiento de ciertos tumores cerebrales, como los gliomas. En estos casos, la TFD actuó como coadyuvante de la intervención quirúrgica y se aplicó posteriormente en la cavidad resultante. La combinación de ambas técnicas evidenció una mejoría significativa en numerosos pacientes tratados.^{12,52,53}

1.7.1.4- Neumonología

La TFD se ha empleado en el tratamiento paliativo del carcinoma broncogénico para disminuir la obstrucción de las vías aéreas y controlar el sangrado, cuando

no es factible extirpar el tumor. La aplicación de esta alternativa terapéutica en pacientes con adenocarcinoma de colon y mama con metástasis endobronquiales, evidenció una reducción en la obstrucción de las vías respiratorias, mejorando consecuentemente la calidad de vida. La TFD también puede emplearse para tratar tumores muy pequeños en pacientes que no son buenos candidatos para los tratamientos convencionales.^{7,30}

1.7.1.5- Otorrinolaringología

La TFD es apropiada para el tratamiento de tumores en cabeza y cuello ya que son pequeños, accesibles y originan metástasis muy lentamente. Numerosos estudios realizados en pacientes con carcinomas de células escamosas situados en la cavidad oral, nasal, faringe y laringe se desarrollaron empleando Photofrin® y Foscan®.^{12,54}

1.7.1.6- Urología

La administración endovenosa de Photofrin® con posterior irradiación transuretral e intravesical ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de carcinoma superficial de vejiga refractario, hiperplasia prostática benigna y cáncer de próstata.^{7,12,25}

1.7.2 - Aplicaciones No Oncológicas

En sus orígenes, la TFD ha estado principalmente enfocada al tratamiento de tumores y patologías precancerosas, sin embargo, durante los últimos años ha experimentado un extenso desarrollo. Así, se han ampliado de manera constante los campos a los que se aplica evidenciando resultados prometedores, mejorando la calidad de vida de los pacientes.¹⁷

1.7.2.1- Dermatología

✓ *Acné y rosácea*: El empleo de la TFD mediante la aplicación tópica de ALA o MAL y posterior irradiación del área afectada con luz roja o policromática reveló resultados prometedores. Una evaluación comparativa entre ambos FS no evidenció diferencias en la efectividad clínica, sin embargo, se observaron efectos adversos más graves y prolongados en los pacientes que recibieron ALA durante el tratamiento. Múltiples estudios informaron una reducción estadísticamente significativa de las lesiones inflamatorias producidas por el acné y del daño histológico en las glándulas sebáceas. En la actualidad, se ha ampliado la aplicación de la TFD al tratamiento de pacientes con rosácea, obteniendo resultados satisfactorios y muy buena tolerancia, sin graves efectos adversos.^{16,47}

✓ *Esclerodermia y liquen escleroso*: Los pacientes con esclerodermia tratados empleando ALA mostraron una disminución en la dureza y grosor de la piel. Se evidenció una mejoría progresiva del eritema, la descamación y la atrofia posterior a cada tratamiento y resolución del prurito, con muy buena tolerancia. Además, se reportaron resultados satisfactorios relacionados con la aplicación de la TFD en pacientes con liquen escleroso, empleando ALA mediante vía tópica.^{47,55,56}

✓ *Fotoenvejecimiento*: Los estudios desarrollados empleando ALA y MAL evidenciaron buena tolerancia con óptimos resultados clínicos, sin incrementar los efectos adversos. Cabe destacar, que este tratamiento presenta un doble efecto beneficioso para los pacientes que presentan signos de fotoenvejecimiento y queratosis actínicas, siendo la tolerancia adecuada y el resultado estético final excelente.^{12,16,47,48}

✓ *Hiperplasia sebácea*: La elevada afinidad de ALA y MAL por las glándulas sebáceas y la posterior activación del agente FS empleando luz roja, garantizan la destrucción de las estructuras glandulares, convirtiendo a la TFD en un método sencillo, no invasivo y seguro para el tratamiento de esta patología.^{47,57}

✓ *Psoriasis*: La TFD empleando ALA para el tratamiento de esta dermatosis inflamatoria, demostró una elevada incidencia de efectos adversos importantes como ardor, sensación de quemadura y dolor, durante y con posterioridad a la irradiación. Si bien la eficacia clínica fue adecuada, en numerosas ocasiones se requirió la suspensión del tratamiento como consecuencia de los efectos adversos asociados, lo que limitó la aplicación de esta terapia.^{47,58}

1.7.2.2- Oftalmología

La degeneración macular asociada a la edad es un trastorno ocular que constituye la principal causa de pérdida de visión central en la población mayor a 55 años, siendo relevante destacar que para aproximadamente el 80% de los pacientes no es adecuado ningún tratamiento. Visudyne® es un producto ampliamente empleado para el tratamiento de esta patología y los excelentes resultados obtenidos mediante TFD han mostrado un futuro esperanzador.^{25,59}

1.7.2.3- Ginecología

El tratamiento del endometrio mediante TFD es un procedimiento que evita la cirugía y se presenta como una alternativa a la histerectomía para mujeres con hemorragias uterinas disfuncionales.⁶⁰

1.7.2.4- Inactivación Fotodinámica

La aparición permanente de nuevas cepas de bacterias resistentes a los antibióticos es, actualmente, un problema importante en la medicina humana y veterinaria^{17,61-63} (Figura 1.7).

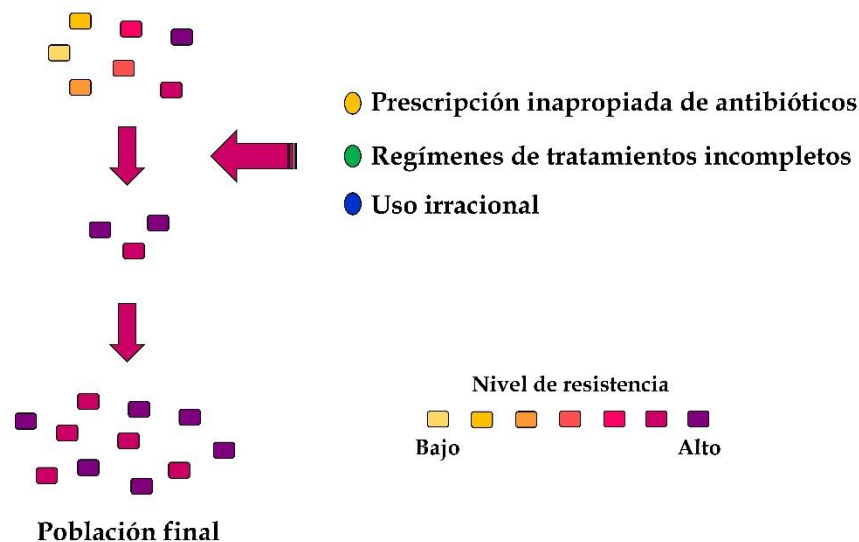


Figura 1.7: Problemática de resistencia a antibióticos

Entre las bacterias con gran resistencia a los antibióticos se destacan especies de *Staphylococcus*. Las infecciones causadas por *Staphylococcus* spp resistente a la meticilina o bien de resistencias múltiples (incluyendo beta-lactámicos, macrólidos y aminoglucósidos) son difíciles de tratar, principalmente en el entorno hospitalario.^{61,63} En este contexto, la investigación moderna en microbiología y áreas relacionadas (biofísica, química, medicina, física) se centraron en el desarrollo de nuevos métodos de tratamiento antimicrobiano, más eficientes, rápidos, no invasivos y no tóxicos, con el objetivo que no condujeran a resistencia microbiana. Mediante el empleo de fuentes de luz, surge la denominada Inactivación Fotodinámica (IFD), que consiste en la administración de una sustancia FS que se fija a la bacteria y posteriormente mediante la irradiación local a una longitud de onda apropiada, genera ERO que

conducen a la muerte microbiana.^{61,62} (**Capítulo 5: “Inactivación Fotodinámica”**).

El $^1\text{O}_2$ es una especie muy electrofílica capaz de interactuar fuertemente con enzimas celulares, conduciendo a la hipoxia celular, inhibición de la glucogenólisis y de la síntesis de proteínas y efectos mutagénicos como consecuencia de modificaciones moleculares en el ADN.^{61,62,64}

Entre las características que debe reunir un agente fotoantimicrobiano ideal se destacan como esenciales que debe ser un compuesto puro, con elevado rendimiento de producción de $^1\text{O}_2$, alta selectividad microbiana y baja toxicidad en células huésped. Además, como propiedades preferibles se señalan elevada solubilidad en medios acuosos y alta fotoestabilidad.⁶⁴

1.8- TRATAMIENTOS FOTODINÁMICOS EN ARGENTINA

1.8.1- Investigaciones en desarrollo

El Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP) en la Universidad de Buenos Aires, se fundó con el respaldo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). El CIPYP, desarrolla un amplio programa de actividades iniciadas en el año 1960, siendo la primera y única institución en Latinoamérica, dedicada al estudio de las porfirinas, porfirias y patologías asociadas, estableciendo una estrecha y eficiente colaboración con profesionales y diversos centros de asistencia médica municipales y privados del país.

Numerosos investigadores de este Centro, se han enfocado en la síntesis y evaluación de nuevos derivados lipofílicos de ALA, como así también en la vehiculización de este compuesto mediante liposomas, como consecuencia de la naturaleza hidrofílica del ALA que condiciona su capacidad de penetración a través de la piel o membranas celulares, limitando por lo tanto el empleo de ALA-TFD al tratamiento de patologías superficiales.⁶⁵⁻⁶⁷

En la Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, un grupo de investigadores de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, desarrollan nuevos agentes FS derivados de macrociclos pirrólicos (porfirinas, subftalocianinas y ftalocianinas) con aplicaciones en IFD. Con la finalidad de incrementar la incorporación intracelular y por lo tanto, la actividad fotodinámica, desarrollan procedimientos apropiados para la síntesis de nuevos derivados sustituidos, con un incremento del carácter anfifílico debido a la presencia de grupos lipofílicos y catiónicos. En primera instancia, la actividad fotodinámica de los nuevos agentes fototerapéuticos es evaluada en sistemas biomiméticos conteniendo sustratos biológicamente activos, en tanto que los estudios *in vitro* los desarrollan empleando diversos cultivos de bacterias y levaduras, mediante la determinación de la actividad fotodinámica y el mecanismo de acción a nivel del ADN, ultraestructuras y envolturas celulares.^{68,69}

Un grupo interdisciplinario de investigadores del Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto, desarrolla nuevos agentes FS derivados de porfirinas para el tratamiento de diversas enfermedades neoplásicas mediante TFD. Uno de los principales objetivos del equipo de investigación es la selección de la molécula apropiada para el desarrollo de diversos estudios *in vivo*, empleando modelos animales. El proyecto consiste en el diseño y la síntesis de nuevos agentes quimioterapéuticos, que se evalúan en una primera instancia, empleando diversos cultivos celulares de mamíferos. Actualmente, los nuevos agentes desarrollados por el grupo de investigación están en la fase de experimentación con ratones.^{70,71}

1.8.2- Fármacos aprobados

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) de nuestro país aprobó diversos fármacos para su aplicación en TFD (Tabla 1.2).⁷²⁻⁷⁶ Uno de ellos es el Photofrin[®], el cual puede ser aplicado en

pacientes con diagnóstico de cáncer endobronquial o esófago de Barrett con displasia severa. También es apropiado su uso para el tratamiento paliativo de cáncer de esófago avanzado.⁷² Por su parte, Levulan Kerastick® (ALA) y Metvix® (MAL) están autorizados para su aplicación en pacientes con cáncer y lesiones precancerosas en la piel.^{73,74} Otros dos fármacos aprobados son Visudyne® (Verteoporfin) y Foscan® (Temoporfin). El primero de ellos, para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad, en tanto que el segundo fármaco es aplicable en cáncer de piel o tumores avanzados de cabeza y cuello.^{75,76}

Tabla 1.2: Fotosensibilizadores clínicos actualmente aprobados en Argentina.

Producto	Fármaco	Fabricante	N° de Certificado
Photofrin®	HpD ^a	Techsphere de Argentina S.A.	54.208
Levulan Kerastick®	ALA ^b	Stiefel Argentina S.A.	53.706
Metvix®	MAL ^c	Galderma Argentina S.A.	53.593
Visudyne®	Verteoporfin	Novartis Pharmaceuticals	48.717
Foscan®	Temoporfin	Techsphere de Argentina S.A.	54.249

^aDerivados de Hematoporfirina; ^bÁcido 5-aminolevulínico; ^c5-aminolevulinato de metilo.

1.9- PRÁCTICA CLÍNICA DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA

El tratamiento mediante TFD se realiza en diversas etapas administrando al paciente en primer lugar, un fármaco FS vía tópica o endovenosa, con un período de espera entre 3 y 96 horas, dependiendo tanto del tumor a tratar, como del FS aplicado y la vía de administración empleada. De este modo, se permite que los niveles de acumulación del fármaco en el tumor sean máximos respecto a los niveles en el tejido normal. Posteriormente, se procede a la irradiación del área afectada mediante luz de longitud de onda adecuada, siendo importante destacar que la emisión de fluorescencia por parte del fármaco permite detectar y localizar el tejido tumoral, facilitando la dirección óptima de las fibras ópticas. La dosis de

luz administrada debe ser la adecuada para que permita generar una respuesta eficaz en el tejido dañado. La acción combinada de luz y el FS, conduce a la generación de radicales y ERO que producen un daño biológico irreversible en la zona tratada, ocasionando la muerte celular^{6,29} (**Figura 1.8**).

La TFD se ha transformado en una modalidad de tratamiento clínico, empleada frecuentemente para diversas formas de cáncer y otras patologías no cancerosas, destacando que su eficiencia depende de la química del FS, las formulación farmacéutica, la concentración de fármaco en el tejido a tratar, las dosis de luz y la cantidad de oxígeno.^{26,35}

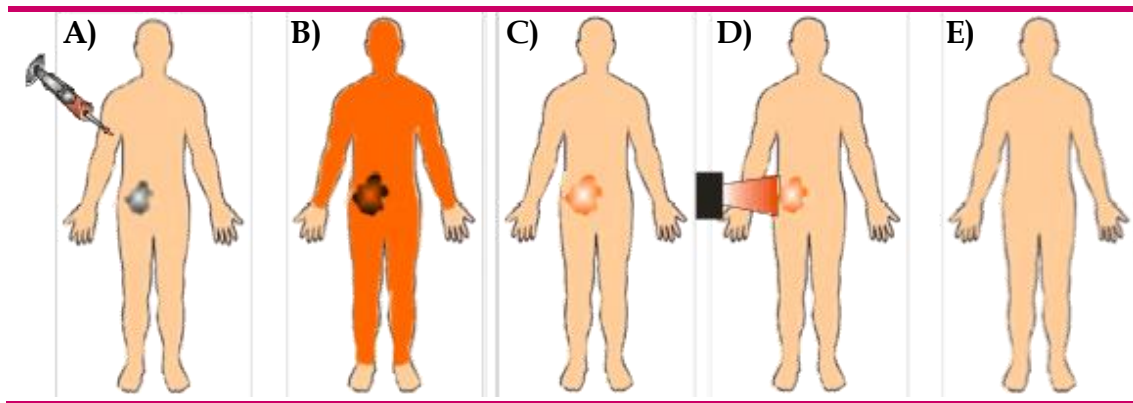


Figura 1.8: Esquema general de la Terapia Fotodinámica. **A)** El fármaco fotosensibilizante se administra por vía endovenosa a un paciente oncológico; **B)** El fotosensibilizador se distribuye en todo el organismo; **C)** Luego de un período óptimo (diferente para cada fármaco) el fotosensibilizador se localiza preferentemente en el tumor. **D)** El área tumoral se irradia con luz de longitud de onda apropiada por un tiempo predeterminado; **E)** Destrucción tumoral.

Durante los últimos años, se han desarrollado diferentes protocolos clínicos para numerosos tipos de cáncer, incluyendo el de pulmón, vejiga, próstata, piel, y diversos tumores en el área del tracto gastrointestinal, cabeza y cuello.³⁰ Cada tratamiento particular requiere su propia combinación óptima de parámetros como concentración de FS, dosis de luz y fuente de irradiación, destacando que

gran parte del trabajo se ha destinado a la determinación de estos parámetros óptimos.⁷

La TFD ha evidenciado un desarrollo constante y en la actualidad existe una extensa y confiable documentación que avala su eficacia para el abordaje de numerosas lesiones preoncológicas y carcinomas cutáneos. Su aplicación al tratamiento de linfomas cutáneos y dermatosis inflamatorias como acné y psoriasis también ha sido exitosa.¹⁹ Esta terapia produce una excelente respuesta en un porcentaje muy alto de pacientes y las recidivas reportadas con posterioridad al tratamiento no son superiores al evidenciado con otras herramientas terapéuticas.²⁶

El desarrollo y la práctica creciente de la TFD es previsible como consecuencia de sus numerosas ventajas frente a los tratamientos convencionales, demostrando ser una excelente alternativa terapéutica para diversas aplicaciones oncológicas y no oncológicas lo que permite estimar que su empleo para estas y otras patologías se amplíe en el futuro.^{6,26}

1.10- BIBLIOGRAFÍA

- [1]- R.R. Allison, K. Moghissi. Oncologic photodynamic therapy: Clinical strategies that modulate mechanisms of action. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013; 10 (4): 331-341.
- [2]- K. Plaetzer, M. Berneburg, T. Kiesslich, T. Maisch. New Applications of Photodynamic Therapy in Biomedicine and Biotechnology. *BioMed Res Int.* 2013; 2013: 1-3. ID 161362.
- [3]- E. Paszko, C. Ehrhardt, M.O. Senge, D.P. Kelleher, J.V. Reynolds. Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2011; 8 (1): 14-29.
- [4]- S.S. Lucky, K.C. Soo, Y. Zhang. Nanoparticles in Photodynamic Therapy. *Chem Rev.* 2015; 115 (4): 1990-2042.

- [5]- V. Monge-Fuentes, L.A. Muehlmann, R. Bentes de Azevedo. Perspectives on the application of nanotechnology in photodynamic therapy for the treatment of melanoma. *Nano Rev.* 2014; 5 (24381).
- [6]- O. Arad, A. Gavaldá, O. Rey, N. Rubio, D. Sánchez-García, J.I. Borrell, J. Teixidó, S. Nonell, M. Cañete, A. Juarranz, A. Villanueva, J.C. Stockert, P.J. Díaz Jiménez. Porfíricos para la fotoquimioterapia del cáncer y otras aplicaciones biomédicas. *Afinidad.* 2002; 59 (500): 343-356.
- [7]- J.E. Brown, S.B. Brown, D.I. Vernon. Photodynamic therapy: new light on cancer treatment. *JSDC.* 1999; 115: 249-253.
- [8]- Ž. Lukšienė. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicina.* 2003; 39 (12): 1137-1150.
- [9]- C.F. Zhu, S. Battah, X. Kong, B.J. Reeder, R.C. Hider, T. Zhou. Design, synthesis and biological evaluation of 5-aminolevulinic acid/3-hydroxypyridinone conjugates as potential photodynamic therapeutic agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 2015; 25 (3): 558-561.
- [10]- D.F. Yang, J.H. Chen, C.P. Chiang, Z. Huang, J.W. Lee, C.J. Liu, J.L. Chang, Y.C. Hsu. Improve efficacy of topical ALA-PDT by calcipotriol through up-regulation of coproporphyrinogen oxidase. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2014; 11 (3): 331-341.
- [11]- J. Takahashi, M. Misawa, H. Iwahashi. Transcriptome analysis of porphyrin-accumulated and X-Ray-irradiated cell cultures under limited proliferation and non-lethal conditions. *Microarrays.* 2015; 4 (1): 25-40.
- [12]- R.R. Allison, C.H. Sibata. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2010; 7 (2): 61-75.
- [13]- E. Alves, M.A.F. Faustino, M.G.P.M.S. Neves, Â. Cunha, H. Nadais, A. Almeida. Potential applications of porphyrins in photodynamic inactivation beyond the medical scope. *J Photochem Photobiol C.* 2015; 22: 34-57.
- [14]- A. Kamkaew, S.H. Lim, H.B. Lee, L.V. Kiew, L.Y. Chung, K. Burgess. BODIPY dyes in photodynamic therapy. *Chem Soc Rev.* 2013; 42 (1): 77-88.

- [15]- M. Olivo, R. Bhuvaneswari, S.S. Lucky, N. Dendukuri, P.S.P. Thong. Targeted Therapy of Cancer Using Photodynamic Therapy in Combination with Multi-faceted Anti-Tumor Modalities. *Pharmaceuticals*. 2010; 3 (5): 1507-1529.
- [16]- M.T. Wan, J.Y. Lin. Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2014; 7: 145-163.
- [17]- S. Nazzal, C.P. Chen, T. Tsai. Nanotechnology in antimicrobial photodynamic inactivation. *J Food Drug Anal*. 2011; 19 (4): 383-395.
- [18]- T. Li, H. Deng, J. Zhao, Y. Gu. Elninochrome A photosensitizers: alternative drugs for photodynamic therapy. *J Innov Opt Health Sci*. 2015; 8 (1). ID 1530001.
- [19]- M.A. Allevato. Terapia fotodinámica, primera parte. *Act Terap Dermatol*. 2006; 29: 302-312.
- [20]- A. Kawczyk-Krupka, J. Waśkowska, A. Raczkowska-Siostrzonek, A. Kościarz-Grzesiok, S. Kwiatek, D. Straszak, W. Latos, R. Koszowski, A. Sieroń. Comparison of cryotherapy and photodynamic therapy in treatment of oral leukoplakia. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2012; 9 (2): 148-155.
- [21]- S.H. Ibbotson. An overview of topical photodynamic therapy in dermatology. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2010; 7 (1): 16-23.
- [22]- I.T. Kato, R.A. Prates, C.P. Sabino, B.B. Fuchs, G.P. Tegos, E. Mylonakis, M.R. Hamblin, M.S. Ribeiro. Antimicrobial photodynamic inactivation inhibits *Candida albicans* virulence factors and reduces *in vivo* pathogenicity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57 (1): 445-451.
- [23]- T. Dai, Y.Y. Huang, M.R. Hamblin. Photodynamic therapy for localized infections-State of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2009; 6 (3-4): 170-188.
- [24]- R. Ackroyd, C. Kelty, N. Brown, M. Reed. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol*. 2001; 74 (5): 656-669.
- [25]- R.R. Allison, H.C. Mota, C.H. Sibata. Clinical PD/PDT in North America: an historical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2004; 1 (4): 263-277.
- [26]- M.R. Detty, S.L. Gibson, S.J. Wagner. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J Med Chem*. 2004; 47 (16): 3897-3915.
- [27]- R.R. Allison, G.H. Downie, R. Cuenca, X.H. Hu, C.J.H. Childs, C.H. Sibata.

- Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2004; 1 (1): 27-42.
- [28]- I. Yoon, J.Z. Li, Y.K. Shim. Advance in Photosensitizers and Light Delivery for Photodynamic Therapy. *Clin Endosc.* 2013; 46 (1): 7-23.
- [29]- A.B. Ormond, H.S. Freeman. Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials.* 2013; 6 (3): 817-840.
- [30]- R. Allison, K. Moghissi, G. Downie, K. Dixon. Photodynamic therapy (PDT) for lung cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2011; 8 (3): 231-239.
- [31]- P.F.C. Menezes, C.A.S. Melo, V.S. Bagnato, H. Imasato, J.R. Perussi. Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct of the photosensitizer Photogem during intense illumination. *Laser Phys.* 2004; 14 (9): 1214-1218.
- [32]- L. Yao, S. Xiao, F. Dan. Boron-Fluorine photosensitizers for photodynamic therapy. *J Chem.* 2013; 2013: 1-10. ID 697850.
- [33]- L.A. Muehlmann, B.C. Ma, J.P. Figueiró Longo, M.F. Menezes, A. Santos, R.B. Azevedo. Aluminum-phthalocyanine chloride associated to poly (methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy. *Int J Nanomedicine.* 2014; 9: 1199-1213.
- [34]- J. Berlanda, T. Kiesslich, V. Engelhardt, B. Krammer, K. Plaetzer. Comparative in vitro study on the characteristics of different photosensitizers employed in PDT. *J Photochem Photobiol B.* 2010; 100 (3): 173-180.
- [35]- Y.N. Konan, R. Gurny, E. Allémann. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2002; 66 (2): 89-106.
- [36]- C.K. Lim, J. Heo, S. Shin, K. Jeong, Y.H. Seo, W.D. Jang, C.R. Park, S.Y. Park, S. Kim, I.C. Kwon. Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of cancer. *Cancer Lett.* 2013; 334 (2): 176-187.
- [37]- Y.Y. Huang, S.K. Sharma, T. Dai, H. Chung, A. Yaroslavsky, M. Garcia-Diaz, J. Chang, L.Y. Chiang, M.R. Hamblin. Can nanotechnology potentiate photodynamic therapy?. *Nanotechnol Rev.* 2012; 1 (2): 111-146.

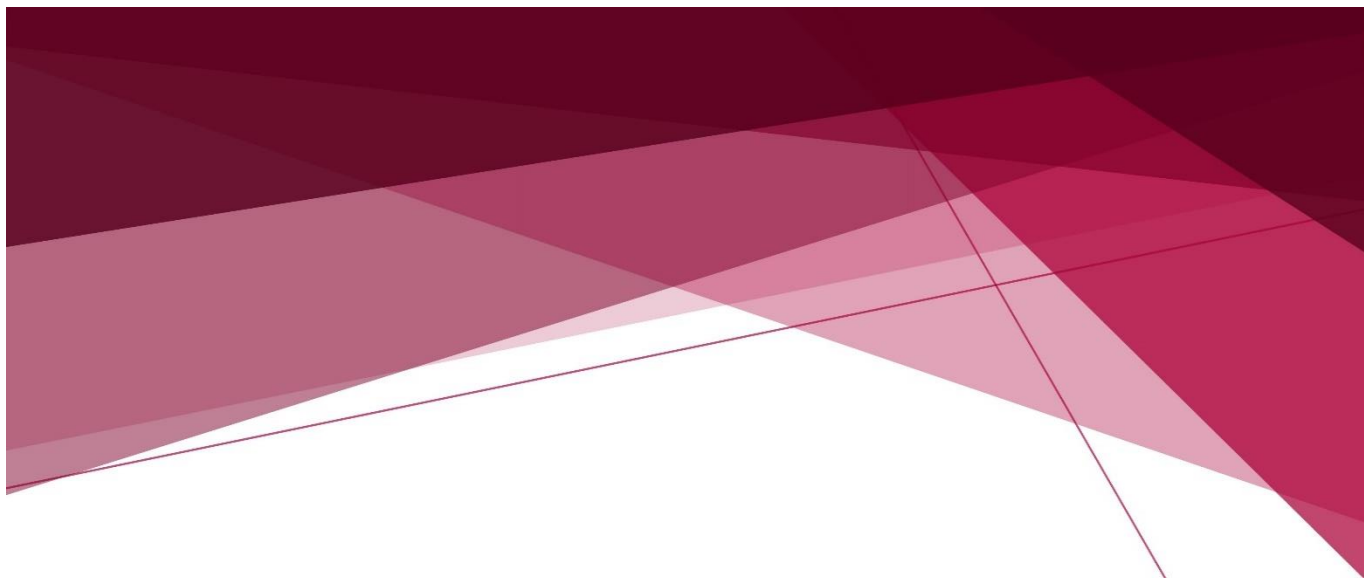
- [38]- B.C. Bae, K. Na. Development of polymeric cargo for delivery of photosensitizer in photodynamic therapy. *Int J Photoenergy*. 2012; 2012: 1-14. ID 431975.
- [39]- D. Bechet, P. Couleaud, C. Frochot, M.L. Viriot, F. Guillemain, M. Barberi-Heyob. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends Biotechnol*. 2008; 26 (11): 612-621.
- [40]- Z. Huang. A review of progress in clinical photodynamic therapy. *Technol Cancer Res Treat*. 2005; 4 (3): 283-293.
- [41]- P. Mroz, A. Yaroslavsky, G.B. Kharkwal, M.R. Hamblin. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers*. 2011; 3 (2): 2516-2539.
- [42]- L. Milla Sanabria, M.E. Rodríguez, I.S. Cogno, N.B. Rumie Vittar, M.F. Pansa, M.J. Lamberti, V.A. Rivarola. Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1835 (1): 36-45.
- [43]- C.A. Robertson, D. Hawkins Evans, H. Abrahamse. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photochem Photobiol B*. 2009; 96 (1): 1-8.
- [44]- M.O. Senge, M.W. Radomski. Platelets, photosensitizers, and PDT. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013; 10 (1): 1-16.
- [45]- S. Anand, B.J. Ortel, S.P. Pereira, T. Hasan, E.V. Maytin. Biomodulatory approaches to photodynamic therapy for solid tumors. *Cancer Lett*. 2012; 326 (1): 8-16.
- [46]- L. Brancalion, H. Moseley. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2002; 17 (3): 173-186.
- [47]- M.A. Allevato. Terapia fotodinámica, segunda parte. *Act Terap Dermatol*. 2006; 29: 374-383.
- [48]- L. Pérez-Pérez, J. García-Gavín, Y. Gilaberte. Daylight-mediated photodynamic therapy in Spain: advantages and disadvantages. *Actas Dermosifiliogr*. 2014; 105 (7): 663-674.

- [49]- Y. Gao, X.C. Zhang, W.S. Wang, Y. Yang, H.L. Wang, Y.G. Lu, D.L. Fan. Efficacy and safety of topical ALA-PDT in the treatment of EMPD. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015; 12 (1): 92-97.
- [50]- C.F. Ribeiro, F.H. Souza, J.M. Jordão, L.C. Haendchen, L. Mesquita, J.V. Schmitt, L.L. Faucz LL. Photodynamic therapy in actinic cheilitis: clinical and anatomopathological evaluation of 19 patients. *An Bras Dermatol.* 2012; 87 (3): 418-423.
- [51]- S. Yano, S. Hirohara, M. Obata, Y. Hagiya, S.I. Ogura, A. Ikeda, H. Kataoka, M. Tanaka, T. Joh. Current states and future views in photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol C.* 2011; 12 (1): 46-67.
- [52]- S. Eljamel. Photodynamic applications in brain tumors: A comprehensive review of the literature. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2010; 7 (2): 76-85.
- [53]- M.C. Tetard, M. Vermandel, S. Mordon, J.P. Lejeune, N. Reyns. Experimental use of photodynamic therapy in high grade gliomas: A review focused on 5-aminolevulinic acid. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2014; 11 (3): 319-330.
- [54]- B. Green, A.R.M. Cobb, C. Hopper. Photodynamic therapy in the management of lesions of the head and neck. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2013; 51 (4): 283-287.
- [55]- E.A. Gordon Spratt, L.V. Gorcey, N.A. Soter, J.A. Brauer. Phototherapy, photodynamic therapy and photophoresis in the treatment of connective-tissue diseases: a review. *Br J Dermatol.* 2014; 1-12.
- [56]- B.J. Osiecka, P. Nockowski, K. Jurczynszyn, P. Ziolkowski. Photodynamic therapy of vulvar lichen sclerosus et atrophicus in a woman with hypothyreosis: case report. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2012; 9 (2): 186-188.
- [57]- A.F. Taub. Cosmetic clinical indications for photodynamic therapy. *Cosmet Dermatol.* 2012; 25 (5): 218-224.
- [58]- F. Almutawa, L. Thalib, D. Hekman, Q. Sun, I. Hamzavi, H.W. Lim. Efficacy of localized phototherapy and photodynamic therapy for psoriasis: a systematic review and meta-analysis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2015; 31: 5-14.

- [59]- K. Athanasakis, V. Fragoulakis, V. Tsiantou, P. Masaoutis, N. Maniadakis, J. Kyriopoulos. Cost-effectiveness analysis of ranibizumab versus Verteporfin photodynamic therapy, pegaptanib sodium, and best supportive care for the treatment of age-related macular degeneration in Greece. *Clin Ther.* 2012; 34 (2): 446-456.
- [60]- M. Wołuhn-Cholewa, K. Szymanowski, E. Nowak-Markwitz, W. Warchoń. Photodiagnosis and photodynamic therapy of endometriotic epithelial cells using 5-aminolevulinic acid and steroids. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2011; 8 (1): 58-63.
- [61]- X.J. Fu, Y. Fang, M. Yao. Antimicrobial photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *BioMed Res Int.* 2013; 2013: 1-9. ID 159157.
- [62]- N. Kashef, G.R.S. Abadia, G.E. Djavid. Phototoxicity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multi-drug resistant *Escherichia coli*. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2012; 9 (1): 11-15.
- [63]- World Health Organization. Antimicrobial resistance. Global Report on Surveillance. 2014.
- [64]- M. Wainwright, H. Mohr, W.H. Walker. Phenothiazinium derivatives for pathogen inactivation in blood products. *J Photochem Photobiol B.* 2007; 86 (1): 45-58.
- [65]- G. Di Venosa, L. Hermida, H. Fukuda, M.V. Defain, L. Rodriguez, L. Mamone, A. MacRobert, A. Casas, A. Batlle. Comparison of liposomal formulations of ALA Undecanoyl ester for its use in photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2009; 96 (2): 152-158.
- [66]- L. Rodriguez, H.S. de Bruijn, G. Di Venosa, L. Mamone, D.J. Robinson, A. Juarranz, A. Batlle, A. Casas. Porphyrin synthesis from aminolevulinic acid esters in endothelial cells and its role in photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2009; 96 (3): 249-254.
- [67]- A. Casas, A. Batlle. Photodynamic therapy in Argentina. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2006; 3 (4): 205-213.

- [68]- D.D. Ferreyra, M.B. Spesia, M.E. Milanesio, E.N. Durantini. 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*. 2014; 282: 16-24.
- [69]- M.E. Milanesio, M.B. Spesia, M.P. Cormick, E.N. Durantini. Mechanistic studies on the photodynamic effect induced by a dicationic fullerene C₆₀ derivative on *Escherichia coli* and *Candida albicans* cells. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013; 10 (3): 320-327.
- [70]- N.B. Rumie Vittar, J. Awruch, K. Azizuddin, V. Rivarola. Caspase-independent apoptosis, in human MCF-7c3 breast cancer cells, following photodynamic therapy, with a novel water-soluble phthalocyanine. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010; 42 (7): 1123-1131.
- [71]- I.S. Cogno, N.B. Rumie Vittar, M.J. Lamberti, V.A. Rivarola. Optimization of photodynamic therapy response by survivin gene knockdown in human metastatic breast cancer T47D cells. *J Photochem Photobiol B*. 2011; 104 (3): 434-443.
- [72]- ANMAT. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. [en línea]. Acceso: Septiembre de 2015. Disponible en la Web: http://www.anmat.gov.ar/EspecMed/abril/especmed_monofarmacos_08.asp.
- [73]- ANMAT. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. [en línea]. Acceso: Septiembre de 2015. Disponible en la Web: http://www.anmat.gov.ar/EspecMed/noviembre/especmed_monofarmacos_07.asp.
- [74]- ANMAT. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. [en línea]. Acceso: Septiembre de 2015. Disponible en la Web: http://www.anmat.gov.ar/ESPECMED/febrero/certificados_monofarmacos07.asp.
- [75]- ANMAT. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. [en línea]. Acceso: Septiembre de 2015. Disponible en la Web: http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/agosto_2012/Dispo_4976-12.pdf.

[76]- ANMAT. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. [en línea]. Acceso: Septiembre de 2015. Disponible en la Web: http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/octubre_2010/Dispo_6673-10.pdf.



CAPÍTULO 2

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS FOTOSENSIBILIZADORES



ÍNDICE CAPÍTULO 2

2.1- INTRODUCCIÓN	49
2.1.1- Familia de las Azinas	51
2.1.2- Familia de las Oxazinas	52
2.1.3- Estrategias de Síntesis	54
2.2- OBJETIVOS	54
2.3- MATERIALES Y MÉTODOS	55
2.3.1- Aspectos Generales	55
2.3.1.1- Materiales	55
2.3.1.2- Equipamiento	56
2.3.1.2.1- <i>Espectrofotometría de absorción UV-Visible</i>	56
2.3.1.2.2- <i>Espectrofotometría de Fluorescencia</i>	56
2.3.1.2.3- <i>Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa (RP-HPLC)</i>	57
2.3.1.2.4- <i>Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)</i>	57
2.3.1.2.5- <i>Espectrometría de Masa</i>	58
2.3.1.2.6- <i>Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)</i>	58
2.3.1.3- Condiciones Generales de Reacción	58
2.3.2- Familia de las Azinas	59
2.3.2.1- <i>Espectrofotometría de absorción UV-Visible</i>	59

2.3.2.2- <i>Espectrofotometría de Fluorescencia</i>	59
2.3.2.3- <i>Cromatografía en Capa Delgada (TLC) y Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa (RP-HPLC)</i>	59
2.3.2.4- <i>Síntesis y Caracterización de Derivados de Azinas</i>	59
2.3.3- Familia de las Oxazinas y Oxazonas	61
2.3.3.1- <i>Espectrofotometría de absorción UV-Visible</i>	61
2.3.3.2- <i>Espectrofotometría de Fluorescencia</i>	62
2.3.3.3- <i>Cromatografía en Capa Delgada (TLC) y Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa (RP-HPLC)</i>	62
2.3.3.4- <i>Separación de los componentes de la muestra comercial de Cresyl Violet</i>	62
2.3.3.5- <i>Síntesis y Caracterización de Derivados de Oxazinas y Oxazonas</i>	63
2.4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
2.4.1- Familia de las Azinas	65
2.4.1.1- <i>Evaluación Cromatográfica de Neutral Red comercial</i>	65
2.4.1.2- <i>Reacciones de Bromación de Neutral Red</i>	67
2.4.1.3- <i>Reacciones de Yodación de Neutral Red</i>	70
2.4.1.4- <i>Reacciones de Metilación de Neutral Red</i>	71
2.4.1.5- <i>Identificación y Caracterización de Neutral Red y Neutral Red monobromado</i>	72
2.4.2- Familia de las Oxazinas y Oxazonas	74
2.4.2.1- <i>Evaluación Cromatográfica de Cresyl Violet Comercial</i>	74

2.4.2.2- Separación de los componentes de la muestra comercial de Cresyl Violet	75
2.4.2.3- Estudio sistemático de las condiciones de reacción: Aspectos generales.....	76
2.4.2.3.1- Reacciones de Bromación de Cresyl Violet.....	76
2.4.2.3.2- Reacciones de Bromación de Cresyl Red.....	79
2.4.2.4- Identificación y Caracterización de Cresyl Violet, Cresyl Violet tribromado, Cresyl Red y Cresyl Red tribromado	80
2.5- CONCLUSIONES	88
2.6- BIBLIOGRAFÍA	88

2.1- INTRODUCCIÓN

En el diseño de FS para fines biológicos es importante considerar la estructura química molecular como un todo, ya que la modificación de un fragmento de la molécula líder puede producir un efecto sobre la distribución electrónica en el cromóforo y por lo tanto en su capacidad fotosensibilizante.¹⁻⁴

Efectuar una ciclización, la expansión de un anillo o la sustitución por un átomo pesado, conduce a un aumento de la lipofilicidad. En términos de comportamiento biológico, este incremento se refleja en una mayor unión a lipoproteínas, lo que puede reducir la biodisponibilidad del FS o exhibir un cambio en el blanco de acción. Tales modificaciones podrían conducir a una alteración de la actividad biológica, debiendo ser consideradas en la etapa de diseño del fármaco, ya que la incorporación celular está determinada por una combinación de carga y lipofilicidad.²⁻⁴

Entre las propiedades generales asociadas con un agente FS exitoso, cabe mencionar la capacidad de poblar el estado $^3\text{FS}^*$ de manera significativa, siendo factible estabilizarlo al incluir átomos con un alto número atómico como consecuencia de las elevadas constantes de acoplamiento spin-orbital, conocido como “efecto de átomo pesado”.^{2,4-7} Se ha reportado que la yodación de compuestos FS conduce a un incremento en la producción de $^1\text{O}_2$, sin embargo, la inclusión de un único átomo de yodo en el cromóforo produce un aumento significativo de la lipofilicidad del compuesto. Así, aunque la molécula resultante exhibirá una capacidad fotosensibilizante incrementada, la distribución biológica y toxicidad se pueden modificar de manera considerable.^{2,3,7}

La inclusión periférica de átomos de yodo y bromo en el cromóforo, como así también azufre y selenio como heteroátomos en los anillos aromáticos correspondientes al cromóforo, es una práctica habitual en la maximización de la producción de $^1\text{O}_2$.^{4,6-8} Ambos enfoques dan origen a FS que son buenos productores de $^1\text{O}_2$, con destacable efecto de átomo pesado.^{2-6,8,9}

Una estrategia empleada para la síntesis de nuevas moléculas FS es la introducción de átomos pesados a fin de incrementar la eficiencia de la transición

electrónica del estado $^1\text{FS}^*$ al estado $^3\text{FS}^*$, mediante cruce entre sistemas, conduciendo a un aumento en la generación de $^1\text{O}_2$.^{5-8,10,11} Una consecuencia adicional de la introducción de estos sustituyentes, es la conversión interna no radiactiva al estado ^0FS o la inhibición de la transferencia de energía del estado $^3\text{FS}^*$ al oxígeno en estado fundamental. Estas vías competitivas ocasionan la pérdida de la energía del estado excitado sin la generación de ERO.¹⁰⁻¹²

Se conoce que para la TFD se requieren FS con elevada longitud de onda de absorción a fin de incrementar la penetración en el tejido, posibilitando el tratamiento de patologías profundas.^{3,13} En relación a esto, la inclusión de átomos pesados en la estructura de un agente FS, frecuentemente conduce a un aumento considerable de la longitud de onda de máxima absorción (λ_{max}).⁴ Se ha reportado que una serie de derivados halogenados de *Nile Blue A* (Familia de las Oxazinas) evidenciaron un aumento significativo de la actividad tanto *in vitro* como *in vivo*, en modelos relativos a la patología del cáncer.^{9,11}

Las diversas propiedades fisicoquímicas de las moléculas también pueden ser modificadas por la inclusión de grupos químicos sencillos, como metilos, los cuales son electrónicamente inertes y no polares, por lo tanto, podría estimarse que no alterarían radicalmente la química molecular. Sin embargo, se reportó que la metilación de una serie de derivados de *Methylene Blue* (MB) incrementó la lipofilidad, la producción de $^1\text{O}_2$ y la actividad fotodinámica de los nuevos derivados en comparación con el precursor.^{1,3,9,14,15} Es importante destacar, que la modificación o incorporación de cadenas laterales auxocrómicas en un compuesto FS, evidencia un efecto menor que la adición de átomos pesados en la estructura molecular.^{1,4,14}

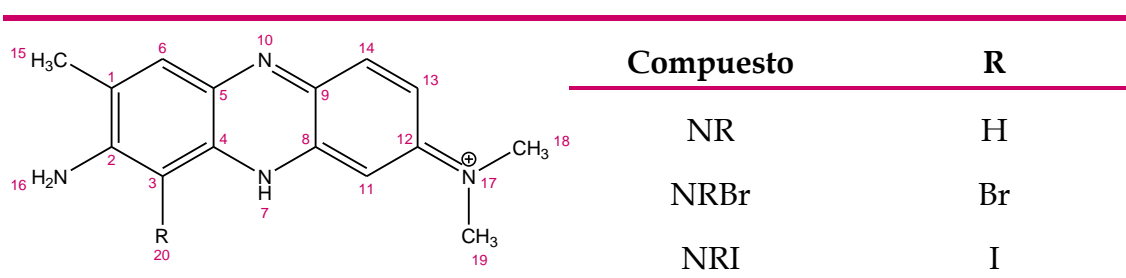
A pesar de la aplicación durante más de un siglo, de una serie de prototipos tanto en la investigación biomédica como en la clínica, actualmente se dispone de un pequeño número de análogos, lo cual dificulta el desarrollo de una relación estructura-actividad.⁹

2.1.1- Familia de las Azinas

Las Azinas constituyen una amplia Familia de compuestos heterocíclicos nitrogenados que difieren en su composición química y propiedades físicas, debido a la diversidad y posición de los grupos funcionales. Actualmente, se han identificado más de 100 compuestos diferentes de origen natural y se sintetizaron aproximadamente 6000 nuevos derivados que incluyen como esqueleto central la estructura de la Familia de las Azinas.^{16,17}

Las Azinas naturales son aisladas como metabolitos secundarios producidos por una amplia gama de bacterias, especialmente *Pseudomonas* spp. Las principales propiedades biológicas de esta clase de compuestos naturales incluyen actividad como antibióticos, antimicrobianos, antipalúdicos, antiparasitarios y antitumorales.^{16,17} Tanto las Azinas naturales como los nuevos derivados sintéticos, son de significativo interés debido al potencial impacto en las interacciones bacterianas y los procesos biotecnológicos. En este aspecto, el continuo interés en las Azinas se debe en gran parte a las propiedades fisicoquímicas que evidencian, incluyendo las características de oxidación-reducción y el viraje de color con el pH.¹⁶

Neutral Red (NR, **Esquema 2.1**) es un compuesto perteneciente a la Familia de las Azinas que presenta numerosas aplicaciones biológicas considerando su naturaleza relativamente no tóxica, entre las cuales se destacan la tinción de partículas celulares e indicador del pH intracelular, como consecuencia de los fuertes cambios de color que experimenta en la región cercana a la neutralidad.^{18,19}



Esquema 2.1: Familia de las Azinas.

Cabe señalar la aplicación de NR con diversos fines en citometría, como una sonda en sistemas biológicos modelo y marcador lisosomal específico, debido a sus propiedades de base débil.^{18,20,21} También se reportó su empleo como sonda para la actividad neuronal.²¹

El compuesto NR demostró ser un buen FS en TFD y se ha descrito que interactúa con numerosos sustratos mediante reacciones de Tipo I.²² Además, este FS se evaluó frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, exhibiendo fototoxicidad en los organismos estudiados y evidenciando propiedades fotoantibacterianas.²³ Frente al virus del Herpes Simple Tipo 1, NR produjo la fotoinactivación completa luego de la irradiación con luz de 470 nm, siendo relevante destacar que el fototratamiento clínico se informó ampliamente en la década de 1970, con aplicación en el campo del herpes genital.²⁴⁻²⁶ Un estudio controlado en pacientes con lesiones herpéticas superficiales indicó que la aplicación tópica de NR y posterior irradiación, produjo una disminución del curso clínico de la infección y la frecuencia de las recaídas.²⁷ Además, se reportó que la fotoinactivación generada por NR es eficaz para el tratamiento de infecciones provocadas por Herpes Simple recurrente.²⁴

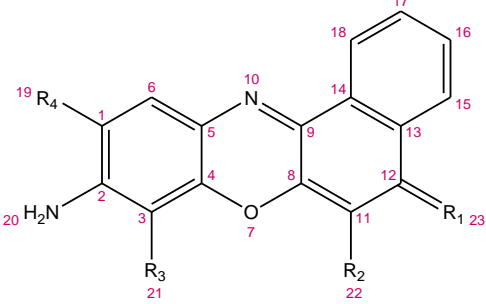
Además, se ha sugerido la aplicación de NR como una terapia antitumoral, principalmente debido a su empleo en la identificación de tejidos cancerosos viables y su eficacia frente al carcinoma humano de células escamosas *in vitro*.^{28,29}

2.1.2- Familia de las Oxazinas

Las Oxazinas constituyen un importante grupo de compuestos orgánicos ampliamente utilizados en histología y biología moderna debido a sus propiedades fotofísicas y elevada fluorescencia.^{30,31} Estas moléculas demostraron ser altamente atractivas por su solvatocromismo y el elevado rendimiento cuántico de fluorescencia.³²

Cresyl Violet (CV, **Esquema 2.2**) pertenece a la Familia de las Oxazinas y presenta numerosas aplicaciones actuales. En biomedicina, se lo utiliza ampliamente como colorante para microscopía óptica y se lo ha aplicado como fármaco en TFD

experimental, en tanto que en otros campos se lo emplea como reactivo analítico.³³⁻³⁵



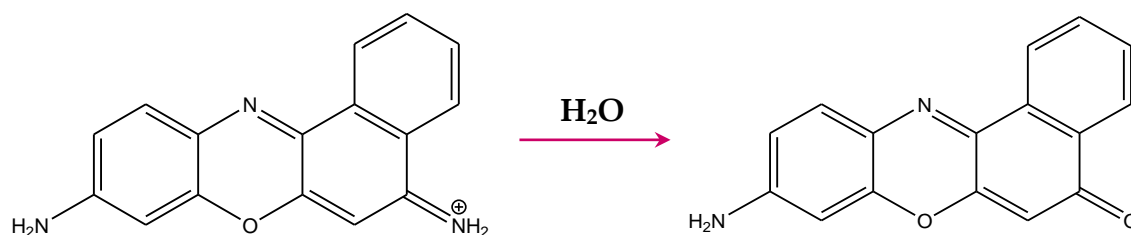
Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
CV	⁺ NH ₂	H	H	H
CVBr ₃	⁺ NH ₂	Br	Br	Br
CR	O	H	H	H
CRBr ₃	O	Br	Br	Br

Esquema 2.2: Familia de las Oxazinas y Oxazonas.

Se ha reportado que CV presenta acción láser* y propiedades fotofísicas interesantes.^{31,36,37} En relación a esto, el compuesto se propuso como estándar en las determinaciones del rendimiento cuántico de fluorescencia, siendo un candidato fotoquímicamente estable.^{37,38} Presenta una población de estado triplete escasamente significativa y el rendimiento cuántico de fluorescencia es independiente de la naturaleza del solvente, excepto en medio acuoso.³⁸

Es importante destacar, que dada la heterogeneidad de los lotes comercialmente disponibles, las aplicaciones más reportadas no detallan una purificación previa, evidenciando una pureza desconocida del compuesto. Se ha reportado que CV se degrada en solución acuosa formando un derivado perteneciente a la Familia de las Oxazonas, denominado *Cresyl Red* (CR, 9-amino-benzo[α]phenoxazin-5-ona, **Esquema 2.2**). Este compuesto, es altamente coloreado y representa una proporción significativa de los lotes comerciales de CV, cuando el producto es manufacturado mediante la clásica ruta sintética de las Oxazinas³⁹ (**Esquema 2.3**).

*Los colorantes láser son grandes moléculas orgánicas que pueden ser empleadas en un láser de colorante.



Esquema 2.3: Reacción de degradación de *Cresyl Violet* en medio acuoso para producir *Cresyl Red*.

2.1.3- Estrategias de síntesis

Los sistemas de anillos deslocalizados de las estructuras químicas correspondientes a las Familias de las Azinas, Oxazinas y Oxazonas, permiten desarrollar diversas modificaciones en términos de propiedades físicas y químicas.³ Un análisis detallado de las estructuras moleculares sugiere dos vías principales para la obtención de análogos: la modificación de los auxocromos y la derivatización del cromóforo.⁹

Una estrategia empleada para la síntesis de nuevos FS es la introducción de átomos pesados en la estructura molecular mediante reacciones de halogenación, con el objetivo de mejorar las propiedades fotoquímicas de los compuestos por “efecto del átomo pesado”. Ésta alternativa permite que los nuevos derivados presenten curvas espectrales caracterizadas por un desplazamiento batocrómico de la λ_{max} .^{10,11} Otra vía sintética, consiste en derivatizar los grupos amino primarios presentes en los prototipos, empleando diferentes sustituyentes alquilo como metilo, etilo, iso-propilo y *n*-propilo, con la finalidad de mejorar las propiedades de los reactivos de partida.¹⁴

2.2- OBJETIVOS

El aspecto integral del crecimiento de la TFD y la IFD como nuevas alternativas terapéuticas, lo constituye el desarrollo de novedosas moléculas FS con mejores

propiedades y especificidad adecuada para cada tipo de patología. Considerando las investigaciones mencionadas anteriormente y diversas propiedades que señalan a NR y CV como FS altamente interesantes, el propósito de este estudio fue el desarrollo de nuevos FS alternativos. En consecuencia, se abordaron diversas vías sintéticas empleando como reactivos de partida compuestos catiónicos pertenecientes a las Familias de las Azinas y Oxazinas, que presentan una absorbancia significativa en la región visible del espectro electromagnético. Las estrategias empleadas fueron la halogenación y la alquilación de grupos amino primarios, con la finalidad de obtener nuevos derivados con propiedades mejoradas y seleccionar el líder con potencial aplicación en la clínica.

Como objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral se desprende la síntesis y caracterización de nuevos compuestos con mejores propiedades fisicoquímicas, fotofísicas y fotoquímicas que los líderes actuales, a fin de revertir las desventajas que éstos presentan, conduciendo a una mejora en el tratamiento de diversas patologías y contribuyendo al desarrollo de la TFD y la IFD.

2.3- MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1- Aspectos Generales

2.3.1.1- Materiales

Neutral Red chloride (NR, 3-amino-7-dimetilamino-2-metil fenazina hidrocloreto, N7005-5G, lote N° 017K1193) y *Cresyl Violet acetate* (CV, 9-amino-5-imino-5H-benzo[α]fenoxazina; C1791-1G, lote N° 093K3731) se adquirieron a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). NR se empleó sin previa purificación, confirmando su pureza > 98% por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (RP-HPLC). CV se purificó mediante Cromatografía en Columna, según **2.4.2.2: "Separación de los componentes de la muestra comercial de Cresyl Violet"**.

Los solventes empleados presentaron calidad analítica o grado HPLC (Cicarelli, Sintorgan, Anedra) y se utilizaron sin purificación previa. Los productos químicos fueron de grado analítico y se adquirieron a Cicarelli, Sintorgan y Anedra. La Cromatografía en Capa Delgada (TLC, *Thin-Layer Chromatography*) se desarrolló empleando placas de sílica gel (250 μm) sobre soporte de aluminio, adquiridas a la firma E. Merck. El análisis de las mismas se realizó en forma visual y bajo luz UV de $\lambda=254$ nm.

Se empleó bromo molecular (Carlo Erba) con una pureza > 99,5% y nitrógeno gaseoso calidad industrial. Las soluciones acuosas se prepararon empleando agua ultrapura del sistema de purificación de Millipore Corporation (Milli-Q®) y el dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) se adquirió a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) con un grado de deuteración > 99,8%.

2.3.1.2- Equipamiento

2.3.1.2.1- Espectrofotometría de absorción UV-Visible

Los estudios se desarrollaron en un espectrofotómetro Agilent 8453 a temperatura ambiente empleando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Las soluciones de los compuestos se prepararon por duplicado y se diluyeron apropiadamente con el mismo solvente, en el momento de realizar las determinaciones.

2.3.1.2.2- Espectrofotometría de Fluorescencia

Los espectros se registraron con un espectrofluorímetro Fluoromax Spex-3, equipado con una celda termostatazada, lámpara de arco de xenón y tubo fotomultiplicador como detector de señal, siendo la intensidad de la luz registrada por un sistema de conteo de fotones. Los espectros de emisión se determinaron en etanol y *N,N*-dimetilformamida (DMF) entre 400 y 800 nm, a temperatura ambiente y empleando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Las

soluciones utilizadas presentaron una absorbancia (Abs) $\sim 0,150$ a la λ_{\max} y se prepararon en el momento de realizar las mediciones.

2.3.1.2.3- Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa (RP-HPLC)

La evaluación de los compuestos se realizó empleando un sistema de HPLC Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) equipado con bomba isocrática, inyector automático, compartimiento termostatzado para columnas y detector espectrofotométrico UV-Visible de longitud de onda variable. Se empleó una columna de fase reversa C18 Supelco® (4,6 mm x 250 mm, 5 μm) con guarda columna y velocidad de flujo de 1,0 mL/min. En todos los ensayos se fijó la temperatura de la columna en 25 °C y el volumen de inyección en 20 μL . El sistema cromatográfico se controló mediante el *software* Agilent ChemStation.

La optimización del procedimiento de RP-HPLC se desarrolló mediante el empleo de diferentes fases móviles, de composición metanólica y acuosa. La fase móvil se filtró a través de una membrana de 0,45 μm (Millipore) y se desgasificó previo a su uso.

2.3.1.2.4- Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros se registraron empleando un espectrómetro Bruker Avance 400 II de Resonancia Magnética Nuclear equipado con una sonda inversa BBI 1H/D-BB ZGRD Z8202/0349 5 mm y una unidad de temperatura variable para RMN ^1H y ^{13}C (Bruker BioSpin, Billerica, MA). Los espectros se realizaron en DMSO- d_6 a temperatura ambiente y se calibraron con ese solvente a 2,504 ppm, siendo la concentración de las muestras ~ 50 mM. Los datos obtenidos se procesaron empleando el *software* Mestre-C 4.9.9.6.

2.3.1.2.5- Espectrometría de Masa

Los espectros de Alta Resolución se registraron en un espectrómetro Bruker Micro QTOF II equipado con una fuente ESI, operado en modo positivo a una temperatura de transferencia iónica de 200°C y voltaje de 5 kV. Las muestras se analizaron a una concentración de 10 µg/mL en metanol calidad HPLC.

Los espectros de masa de ionización por electrospray (ESI-MS) se determinaron en un espectrómetro Varian 1200L Triple cuadrupolo-LC-MS, operado en el modo positivo y para la adquisición de datos se empleó el programa Varian MS-MS Workstation (Versión 6.6). Las muestras con una concentración de 5 µg/mL en acetonitrilo grado HPLC, se inyectaron directamente en el equipo.

Por su parte, los espectros de masa de impacto electrónico (EI-MS) se registraron en estado sólido empleando un espectrómetro cuadrupolar Finnigan 3300 F-100 a 70 eV.

2.3.1.2.6- Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros se registraron en el intervalo de 4000-600 cm⁻¹ empleando un espectrómetro de FT-IR Nicolet 5SXC. Las muestras se dispersaron en pastillas de KBr y los datos obtenidos se procesaron empleando el *software* OMNIC E.S.P. 5.1.

2.3.1.3- Condiciones Generales de Reacción

En todos los experimentos, las mezclas de reacción se agitaron constantemente con protección de la luz. Las soluciones correspondientes a los distintos reactivos se prepararon en el momento de ser utilizadas. El solvente se eliminó a presión reducida empleando un evaporador rotatorio Büchi Rotavapor R-114, equipado con un baño Büchi waterbath B-480. El progreso de las reacciones y la pureza de los compuestos se evaluaron mediante TLC y RP-HPLC. El residuo sólido obtenido en cada una de las reacciones se analizó mediante RP-HPLC.

2.3.2- Familia de las Azinas

2.3.2.1- Espectrofotometría de absorción UV-Visible

Los espectros de absorción se determinaron en función de la concentración (10^{-6} a 10^{-4} M) entre 200 y 700 nm empleando diversos solventes como acetona, acetonitrilo, diclorometano, cloroformo, etanol, isopropanol y metanol.

2.3.2.2- Espectrofotometría de Fluorescencia

La excitación de los compuestos se realizó a la longitud de onda de máxima absorción (λ_{ex} en DMF: NR= 450 nm; NRBr= 450 nm. λ_{ex} en etanol: NR=537 nm; NRBr=545 nm).

2.3.2.3- Cromatografía en Capa Delgada (TLC) y Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa (RP-HPLC)

La metodología mediante TLC se desarrolló empleando cloroformo - metanol (92,5: 7,5 v/v) como sistema de solventes. La mejor resolución cromatográfica por RP-HPLC se obtuvo mediante el empleo de una mezcla metanol - solución acuosa de fosfato de trietilamonio (TEAP) 83 mM (70:30 v/v) como fase móvil. El detector espectrofotométrico UV-Visible se fijó a 280 nm y 540 nm.

2.3.2.4- Síntesis y Caracterización de Derivados de Azinas

✓ *Neutral Red (NR)*⁴⁰⁻⁴²: RMN-¹H (DMSO-*d*₆; 400,1 MHz): δ (ppm) 2,32 (s, 3H, **15**); 3,22 (s, 6H, **18** y **19**); 6,76 (d, 1H, $J_{\text{meta}} = 2,5$; **11**); 6,89 (s, 1H, **20**); 7,45 (dd, 1H, $J_{\text{orto}} = 9,69$; $J_{\text{meta}} = 2,48$; **13**); 7,74 (s, 1H, **6**); 7,86 (d, 1H, $J_{\text{orto}} = 9,69$; **14**). RMN-¹³C (DMSO-*d*₆; 100,6 MHz): δ (ppm) 18,2 (**15**); 40,4 (**18** y **19**); 92,3 (**11**); 93,1 (**3**); 119,0 (**13**); 131,0 (**1**); 131,2 (**6**); 131,8 (**14**); 133,9 (**9**); 134,2 (**5**); 135,3 (**4**); 137,0 (**8**); 154,1 (**2**);

156,6 (12). IR (KBr, cm^{-1}): ν 1629, 1530, 1503 (C=C); 1202, 1012 (C-N); 810 (C-H). t_R RP-HPLC (min., $n=7$): $4,72 \pm 0,07$. R_f TLC ($n=7$): $0,20 \pm 0,05$. EI-MS (70 eV, m/z): 252 $[M]^+$, 209, 181. ESI-MS (m/z): 253,1 $[MH]^+$, MS-MS (m/z): 237,0; 210,0. HRMS (ESI): calculado para $C_{15}H_{17}N_4$ $[MH]^+$: 253,3224; encontrado: 253,1466. (Anexo 1).

✓ *Neutral Red monobromado (NRBr)*: Se disolvieron 10,0 mg del compuesto comercial NR ($3,46 \times 10^{-5}$ moles) en 10 mL de ácido acético glacial y se adicionó, con agitación constante y mediante goteo, una solución de bromo molecular en el mismo solvente ($3,46 \times 10^{-5}$ moles, 5 mL). La reacción se finalizó mediante burbujeo con nitrógeno y el solvente se eliminó a presión reducida (55-60 °C). El residuo sólido obtenido se disolvió en 10 mL de etanol, se filtró a través de una membrana de 0,45 μm (Millipore) y el solvente se eliminó a presión reducida (40 °C). Las condiciones óptimas para la obtención de éste derivado, involucraron la relación molar NR: bromo (1:1) y 30 minutos de reacción a temperatura ambiente. El producto final se obtuvo con una pureza relativa > 98% determinada por RP-HPLC.

RMN- ^1H (DMSO- d_6 ; 400,1 MHz): δ (ppm) 2,41 (s, 3H, 15); 3,24 (s, 6H, 18 y 19); 7,21 (s, 1H, 11); 7,52 (d, 1H, $J_{\text{orto}} = 9,61$; 13); 7,74 (s, 1H, 6); 7,85 (d, 1H, $J_{\text{orto}} = 9,61$; 14). RMN- ^{13}C (DMSO- d_6 ; 100,6 MHz): δ (ppm) 19,2 (15); 43,5 (18 y 19); 94,9 (11); 98,0 (3); 120,3 (13); 123,0 (1); 129,7 (6); 130,6 (14); 131,6 (5); 135,7 (9); 136,5 (8); 148,4 (2); 152,3 (4); 154,4 (12). IR (KBr, cm^{-1}): ν 1621, 1532, 1471 (C=C); 1200, 1020 (C-N); 907, 818 (C-H); 671 (C-Br). t_R RP-HPLC (min., $n=7$): $6,43 \pm 0,08$. R_f TLC ($n=7$): $0,70 \pm 0,06$. EI-MS (70 eV, m/z): 330 $[M]^+$, 332 $[M+2]^+$, 287, 250, 235, 207. ESI-MS (m/z): 331,0 $[MH]^+$, 332,9 $[MH+2]^+$, MS-MS (m/z): 251,0. HRMS (ESI): Calculado para $C_{15}H_{16}BrN_4$ $[MH]^+$: 331,0553; $[MH+2]^+$: 333,0533; encontrado: 331,0564; 333,0547. (Anexo 2).

✓ *Neutral Red monoyodado (NRI)*: Se disolvieron 3,0 mg del compuesto comercial NR ($1,04 \times 10^{-5}$ moles) en 3 mL de una mezcla de ácido acético glacial: agua (9:1 v/v) y se adicionaron consecutivamente, con agitación constante,

soluciones de 2,2 mg de peryodato de sodio ($1,04 \times 10^{-5}$ moles, 3 mL); 1,2 mg de cloruro de sodio ($2,08 \times 10^{-5}$ moles, 3 mL) y 1,7 mg de yoduro de potasio* ($1,04 \times 10^{-5}$ moles, 3 mL) en el mismo sistema de solventes. El medio de reacción se eliminó a presión reducida (60 °C) y el residuo sólido se disolvió en diclorometano. Posteriormente se filtró a través de una membrana de 0,45 μm (Millipore) y el solvente se eliminó a presión reducida (35 °C). Las condiciones óptimas de reacción involucraron la relación molar NR: peryodato de sodio: yoduro de potasio: cloruro de sodio (1:1:1:2) y 6 horas de reacción a 25 °C.

El nuevo derivado obtenido mostró ser inestable en diversas condiciones evaluadas. t_R RP-HPLC (min., n=7): $8,1 \pm 0,1$. R_f TLC (n=7): $0,55 \pm 0,04$. IE-MS (70 eV, m/z): 380 [M]⁺, 282, 208, 153.

✓ *Neutral Red dimetilado (NR(CH₃)₂)*: Se disolvieron 3,3 mg del compuesto comercial NR ($1,14 \times 10^{-5}$ moles) en 12 mL de acetonitrilo y se adicionó mediante goteo, a temperatura ambiente y con agitación constante, una solución de yoduro de metilo en el mismo solvente ($2,28 \times 10^{-5}$ moles; 0,29 mL) con una relación molar de reactivos NR: yoduro de metilo (1:2). Luego de 48 horas de reacción y sin detectar nuevos productos, el sistema se sometió a reflujo (~ 75 °C) durante 96 horas, sin embargo, no se obtuvo ningún nuevo derivado.

2.3.3- Familia de las Oxazinas y Oxazonas

2.3.3.1- Espectrofotometría de absorción UV-Visible

Las mediciones espectrofotométricas se determinaron entre 200 nm y 800 nm, empleando diversos solventes como acetona, acetonitrilo, diclorometano, etanol, isopropanol y metanol.

*El yoduro de potasio es muy inestable en medio ácido y se descompone rápidamente para formar ácido yodhídrico, dando origen a una solución de color amarillo intenso.

2.3.3.2- Espectrofotometría de Fluorescencia

La excitación de los compuestos se realizó a la longitud de onda de máxima absorción (λ_{ex} en DMF: CV= 480 nm; CVBr₃= 475 nm; CR= 514 nm; CRBr₃= 498 nm. λ_{ex} en etanol: CV= 601 nm; CVBr₃= 595 nm; CR= 515 nm; CRBr₃= 498 nm).

2.3.3.3- Cromatografía en Capa Delgada (TLC) y Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa (RP-HPLC)

La mejor resolución cromatográfica en TLC se obtuvo empleando cloroformo-metanol (4:1 v/v) como sistema de solventes. Una óptima resolución cromatográfica por RP-HPLC se obtuvo mediante el empleo de una mezcla metanol - solución acuosa de TEAP 83 mM (80:20 v/v) como fase móvil. El detector espectrofotométrico UV-Visible se fijó a 280 nm, 510 nm y 590 nm.

2.3.3.4- Separación de los componentes de la muestra comercial de Cresyl Violet

Los componentes, CV y CR, que conforman la muestra comercial de CV, se separaron y purificaron mediante Cromatografía en Columna. La metodología se desarrolló empleando sílica gel de 70-230 mesh, con un diámetro de poro de 60Å, adquirida a la firma Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La separación de los compuestos se realizó utilizando una columna de vidrio (457 mm x 15 mm) empaquetada con aproximadamente 27 g de sílica gel. Los eluyentes se seleccionaron de manera preliminar mediante TLC, evidenciando que la mezcla de solventes cloroformo - metanol permitiría una adecuada separación de los componentes.

Una muestra correspondiente a ~ 15 mg de compuesto comercial se disolvió en etanol, se adsorbió sobre sílica gel (relación muestra - sílica ~ 1:65) y se sembró en la parte superior de la columna. La elución inicial se realizó con ~ 250 mL de cloroformo, lo que permitió la completa eliminación de impurezas de baja polaridad. A continuación, se desarrolló un gradiente de elución empleando el sistema de solventes cloroformo - metanol, desde 0% hasta 100% de metanol, lo

que posibilitó la separación y obtención de los principales componentes de la muestra comercial, CV y CR, con un alto grado de pureza.

Ambos compuestos se obtuvieron en ~ 100 fracciones de 5 mL cada una. La eficacia del procedimiento de purificación se constató mediante TLC y RP-HPLC. Las fracciones puras correspondientes a cada entidad química se combinaron eliminando el solvente por evaporación a presión reducida y los residuos sólidos obtenidos se mantuvieron en desecador a temperatura ambiente hasta peso constante. La columna cromatográfica y las muestras obtenidas se protegieron de la luz durante todo el procedimiento.

2.3.3.5- Síntesis y Caracterización de Derivados de Oxazinas y Oxazonas

✓ *Cresyl Violet (CV)*⁴³: RMN-¹H (DMSO-*d*₆; 400,1 MHz): δ (ppm) 6,36 (s,1H, **21**); 6,39 (s,1H, **22**); 6,49 (d,1H, **19**); 7,31 (d,1H, **6**); 7,64 (m, 2H, **16** y **17**); 8,35 (d,1H, **15**); 8,42 (d,1H, **18**). RMN-¹³C (DMSO-*d*₆; 100,6 MHz): δ (ppm) 98,6 (**3**); 105,5 (**11**); 111,4 (**1**); 123,9 (**18**); 124,2 (**2**); 124,7 (**15**); 130,4 (**17**); 130,5 (**16**); 130,7 (**6**); 131,3 (**13**); 132,2 (**14**); 141,6 (**9**); 146,2 (**8**); 146,3 (**5**); 152,9 (**4**); 163,6 (**12**). IR (KBr, cm^{-1}): ν 3339 (NH₂); 2918 (C-N); 1487 (NH₂); 1339 (C-N + C-N-H); 1259, 1151, 1106 (C-H + NH₂); 834, 770, 700 (C-H). *t_R* RP-HPLC (min., n=7): 5,42 \pm 0,08. *R_f* TLC (n=7): 0,39 \pm 0,02. EI-MS (70 eV, *m/z*): 261 [M]⁺, 234, 207, 149. HRMS (ESI): calculado para C₁₆H₁₂N₃O [MH]⁺: 262,2861; encontrado: 262,1021. (**Anexo 3**).

✓ *Cresyl Violet tribromado (CVBr₃)*: Se disolvieron 15,0 mg del compuesto CV previamente purificado por Cromatografía en Columna ($4,67 \times 10^{-5}$ moles) en 20 mL de metanol grado HPLC y se adicionó mediante goteo una solución de bromo molecular en el mismo solvente ($1,49 \times 10^{-4}$ moles, 5 mL). La reacción se finalizó con burbujeo de nitrógeno, el producto final se filtró a través de una membrana de 0,45 μm (Millipore) y el solvente se eliminó a presión reducida (40 °C). Las condiciones óptimas para la obtención de éste derivado, involucraron una relación molar CV: bromo (1:3,2) y 30 minutos de reacción a temperatura

ambiente. El producto final se obtuvo con una pureza relativa > 98% determinada por RP-HPLC.

RMN-¹H (DMSO-d₆; 400,1 MHz): δ (ppm) 7,94 (s,1H,15); 8,04 (s,1H,17); 8,29 (s,1H,6); 8,74 (s, 2H, 16 y 18). **RMN-¹³C (DMSO-d₆; 100,6 MHz): δ (ppm)** 92,6 (3); 94,9 (11); 108,7 (1); 123,7 (13); 125,2 (16); 125,9 (17); 128,7 (2); 130,2 (14); 131,8 (15); 133,6 (6); 133,9 (18); 137,3 (9); 144,1 (5); 149,5 (8); 150,2 (4); 160,0 (12). **IR (KBr, cm⁻¹):** ν 3240 (NH₂); 2920 (C-N); 1457 (N-H); 1315 (C-N); 1245, 1146, 1100 (C-H + N-H); 910, 773, 703 (C-H). **t_R RP-HPLC (min., n=7):** 8,0 ± 0,6. **R_f TLC (n=7):** 0,59 ± 0,03. **EI-MS (70 eV, m/z):** 498 [M]⁺ 446, 419, 340, 281, 207. **HRMS (ESI):** Calculado para C₁₇H₁₀Br₃N₂O [MH]⁺: 495,8296; [MH+2]⁺: 497,8275; [MH+4]⁺: 499,8255; [MH+6]⁺: 501,8234; encontrado: 495,8304; 497,8291; 499,8273; 501,8218. (Anexo 4).

✓ **Cresyl Red (CR): RMN-¹H (DMSO-d₆; 400,1 MHz): δ (ppm)** 6,31 (s,1H,22); 6,53 (d,1H,21); 6,68 (dd,1H,19); 7,54 (d,1H,6); 7,70 (t,1H,17); 7,79 (t,1H,16); 8,12 (d,1H,15); 8,54 (d,1H,18). **RMN-¹³C (DMSO-d₆; 100,6 MHz): δ (ppm)** 98,1 (3); 105,1 (11); 113,2 (1); 123,8 (18); 125,0 (2); 125,5 (15); 130,1 (14); 130,4 (17); 131,6 (13); 131,7 (6); 132,1 (16); 138,6 (9); 146,8 (5); 152,2 (8); 154,5 (4); 182,4 (12). **IR (KBr, cm⁻¹):** ν 3425 (NH₂); 2961 (C-N); 1739 (C=O); 1463 (NH₂); 1374 (C-N + C-N-H); 1261, 1100, 1020 (C-H + NH₂); 800, 671 (C-H). **t_R RP-HPLC (min., n=7):** 8,9 ± 0,2. **R_f TLC (n=7):** 0,84 ± 0,02. **EI-MS (70 eV, m/z):** 262 [M]⁺, 234, 205, 178, 150. **HRMS (ESI):** calculado para C₁₆H₁₁N₂O₂ [MH]⁺: 263,2708; encontrado: 263,0825. (Anexo 5).

✓ **Cresyl Red tribrominado (CRBr₃):** Se disolvieron 15,0 mg del compuesto CR previamente purificado por Cromatografía en Columna (5,72x10⁻⁵ moles) en 20 mL de una mezcla cloroformo - metanol (7:3 v/v) y se adicionó mediante goteo una solución de bromo molecular en el mismo sistema de solventes (1,83x10⁻⁴ moles, 5 mL). La reacción se finalizó con burbujeo de nitrógeno, el producto final se filtró a través de una membrana de 0,45 μm (Millipore) y el solvente se eliminó a presión reducida (40 °C). Las condiciones óptimas para la obtención de éste derivado, involucraron una relación molar CR: bromo (1:3,2) y 30 minutos de

reacción a temperatura ambiente. El producto final se obtuvo con una pureza relativa > 98% determinada por RP-HPLC.

RMN-¹H (DMSO-d₆; 400,1 MHz): δ (ppm) 7,89 (t,1H,16); 7,99 (t,1H,17); 8,17 (s,1H,6); 8,31 (d,1H,15); 8,67 (d,1H,18). El compuesto presentó muy baja solubilidad en DMSO-d₆ y cloroformo deuterado (CDCl₃) por lo que no se pudo registrar el espectro de RMN-¹³C. **IR (KBr, cm⁻¹):** ν 3375 (NH₂); 2955 (C-N); 1742 (C=O); 1457 (N-H); 1374 (C-N + C-N-H); 1259, 1095, 1014 (C-H + N-H); 800, 660 (C-H). **t_R RP-HPLC (min., n=7):** 30 ± 2. **R_f TLC (n=7):** 0,91 ± 0,06. **EI-MS (70 eV, m/z):** 500 [M]⁺ 446, 336, 284, 256, 207. **HRMS (ESI):** Calculado para C₁₇H₈Br₃NO₂ [MNa]⁺: 518,7950; [MNa+2]⁺: 520,7930; [MNa+4]⁺: 522,7909; [MNa+6]⁺: 524,7889; encontrado: 518,7887; 520,7951; 522,7933; 524,7784. (Anexo 6).

2.4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1- Familia de las Azinas

2.4.1.1- Evaluación Cromatográfica de Neutral Red comercial

La evaluación de la muestra comercial de NR se realizó mediante el desarrollo de una metodología por RP-HPLC, efectuando la detección a 540 nm, λ_{\max} del compuesto.

La evaluación de diversas proporciones de metanol - solución acuosa de TEAP y diferentes concentraciones de esta última, permitió determinar como fase móvil óptima para una adecuada evaluación cromatográfica, metanol - solución acosa de TEAP 83 mM (70:30 v/v). Se estableció que la muestra comercial contiene ~98% de NR, por lo cual no requirió purificación previa (**Figura 2.1.A**).

Además, la pureza del compuesto comercial se corroboró por TLC empleando diversas fases móviles y estableciendo como óptima la mezcla cloroformo - metanol (92,5:7,5 v/v).

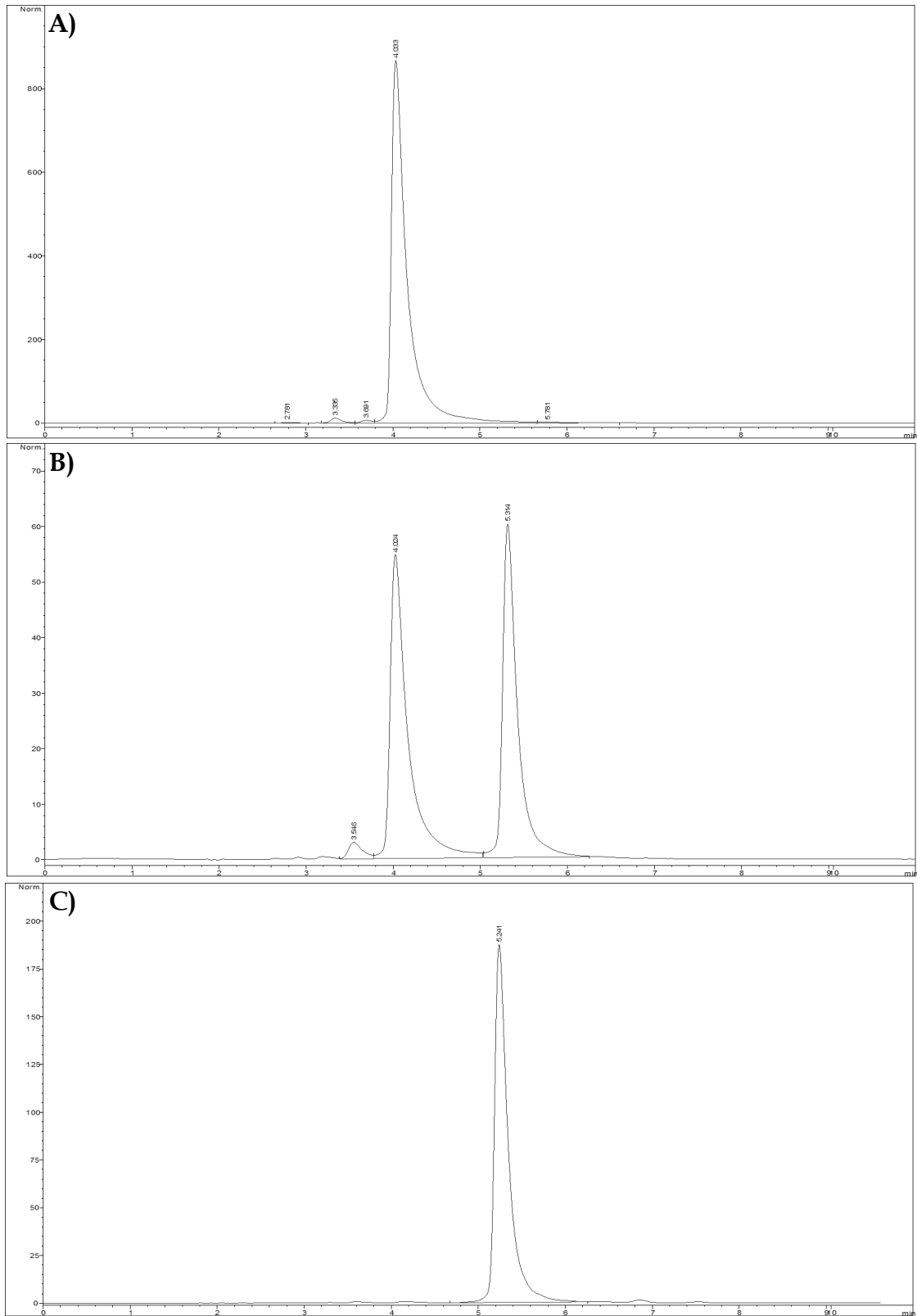


Figura 2.1: Cromatogramas RP-HPLC. Relaciones *Neutral Red*: bromo: A) 1:0; B) 1:0,85; C) 1:1.

2.4.1.2- Reacciones de Bromación de Neutral Red

La estructura química del compuesto NR está activada para la participación en reacciones de sustitución electrofílica aromática, ya que presenta grupos amino fuertemente activantes, determinando múltiples posiciones halogenables (**Esquema 2.1**). Se desarrolló un estudio sistemático de las condiciones de reacción considerando la concentración de bromo molecular (agente halogenante), tiempos de reacción y diferentes medios como metanol y ácido acético glacial.

Se determinaron como condiciones óptimas para la síntesis del nuevo derivado *Neutral Red* monobromado (NRBr) la relación molar NR: bromo (1:1), 30 minutos de reacción y ácido acético glacial como solvente. El nuevo compuesto se obtuvo con una pureza relativa > 98% determinada por RP-HPLC, lo cual indicó que no era necesaria una purificación adicional.

En la **Tabla 2.1** se presentan las condiciones experimentales más significativas ensayadas para la obtención de NRBr. Relaciones molares inferiores a 1:1 condujeron a la obtención de una mezcla del reactivo de partida y el nuevo derivado, en tanto que a la relación 1:1 se obtuvo el compuesto NRBr, de manera cuantitativa (**Figura 2.1, Anexo 7**).

Tabla 2.1: Síntesis de *Neutral Red* monobromado.

Condiciones: Ácido acético glacial; 2 horas de reacción.

Relación molar NR:Br ₂	Resultados (%)*	
	NR	NRBr
1:0	98,72	ND
1:0,80	64,98	32,43
1:0,85	50,78	46,99
1:0,90	40,67	56,23
1:0,95	12,83	85,96
1:1,00	ND	98,16

*Porcentaje relativo obtenido por RP-HPLC; ND: No Detectable.

El nuevo derivado NRBr presentó baja solubilidad en el medio de reacción, lo cual dificultó la síntesis de los derivados polibromados de NR. Las relaciones molares NR: bromo mayores a 1:1, sólo permitieron obtener pequeñas cantidades de los nuevos derivados polibromados (**Tabla 2.2**).

Tabla 2.2: Síntesis de *Neutral Red* dibromado y *Neutral Red* tribromado.

Condiciones: Ácido acético glacial; 2 horas de reacción.

Relación molar NR:Br ₂	Resultados (%) [*]		
	NRBr	NRBr ₂	NRBr ₃
1:1,0	98,16	ND	ND
1:1,2	95,37	4,63	ND
1:1,8	94,27	3,16	2,57
1:2,0	90,95	5,00	4,05
1:2,2	92,77	3,76	3,47
1:2,8	89,67	5,36	4,97
1:3,0	90,54	5,05	4,36
1:3,2	90,12	6,04	3,84

^{*}Porcentaje relativo obtenido por RP-HPLC; ND: No Detectable.

Como consecuencia, se desarrollaron matrices de síntesis empleando metanol como solvente y diversas relaciones molares NR: bromo. La evaluación por RP-HPLC evidenció la aparición de dos picos con t_R mayores que NRBr, atribuibles presumiblemente a *Neutral Red* dibromado (NRBr₂) y *Neutral Red* tribromado (NRBr₃). Cabe señalar que las relaciones molares de NR: bromo superiores a 1:2,8 condujeron a la precipitación de diversos sub-productos de reacción, visualizados mediante RP-HPLC. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 2.3**.

Tabla 2.3: Síntesis de *Neutral Red* dibromado y *Neutral Red* tribromado.

Condiciones: Metanol; 2 horas de reacción.

Relación molar NR:Br ₂	Resultados (%)*			
	NR	NRBr	NRBr ₂	NRBr ₃
1:0	91,43	ND	ND	ND
1:0,8	16,47	62,64	ND	ND
1:1,0	10,65	70,17	2,11	4,58
1:1,2	4,97	73,68	2,70	5,97
1:1,8	ND	33,07	11,62	37,42
1:2,0	ND	22,48	15,15	45,38
1:2,2	ND	12,13	16,59	46,74
1:2,8	ND	ND	20,28	37,64
1:3,0	ND	ND	16,49	34,87
1:3,2	ND	ND	17,71	34,76
1:4,0	ND	ND	27,92	36,89
1:5,0	ND	ND	25,03	22,64

*Porcentaje relativo obtenido por RP-HPLC; ND: No Detectable.

Además, la evaluación del tiempo de reacción empleando una relación molar NR: bromo (1:2), no permitió obtener los nuevos derivados polibromados en proporciones significativas (**Tabla 2.4**). Por lo tanto, las distintas condiciones experimentales ensayadas, como tiempos de reacción, solventes y relaciones molares NR: bromo, no condujeron a los nuevos compuestos como productos mayoritarios.

La dificultad para sintetizar los derivados polibromados en proporciones significativas, puede deberse al impedimento estérico, ya que los voluminosos átomos de bromo deberían ingresar en las posiciones orto a la amina terciaria⁴⁴ (**Esquema 2.1**).

Tabla 2.4: Síntesis de *Neutral Red* dibromado y *Neutral Red* tribromado.Condiciones: Metanol; relación molar *Neutral Red*: bromo (1:2).

Tiempo (min.)	Resultados (%)*		
	NRBr	NRBr ₂	NRBr ₃
15	65,83	6,89	14,75
30	81,05	3,41	9,77
45	69,81	3,51	10,19
60	80,41	3,51	10,07
75	81,39	3,43	9,54
90	80,71	3,48	10,57
105	80,54	3,41	10,44
120	81,84	3,39	9,24
135	79,63	3,49	10,01
4080 (68 h)	Aparición de nuevos picos - mezcla compleja		

*Porcentaje relativo obtenido por RP-HPLC.

2.4.1.3- Reacciones de Yodación de *Neutral Red*

Con el mismo fundamento por el cual se realizó la bromación de NR, se desarrolló un estudio sistemático de las condiciones de reacción a fin de sintetizar el derivado monoyodado de NR. Numerosos trabajos científicos avalan que las reacciones de yodación presentan mayor dificultad que las correspondientes de bromación, siendo más drásticas las condiciones necesarias para generar el agente halogenante.^{45,46}

Se ensayaron diversas relaciones molares de los reactivos, tiempos de reacción y temperaturas, observando en todos los casos un sub-producto de reacción por RP-HPLC (Tabla 2.5). Se determinaron como condiciones óptimas para la obtención del nuevo derivado *Neutral Red* monoyodado (NRI) la relación NR: peryodato de sodio: yoduro de potasio: cloruro de sodio (1:1:1:2), 25 °C y 6 horas de reacción.

Tabla 2.5: Síntesis de *Neutral Red* monoyodado.

Condiciones: Relación de *Neutral Red*: peryodato de sodio: yoduro de potasio: cloruro de sodio (1:1:1:2) a 25 °C.

Tiempo (horas)	Resultados (%)*		
	NR	NRI	Sub-producto
3	17,95	49,01	17,99
4	16,45	39,51	12,33
5	8,43	43,49	22,77
6	3,16	75,09	20,52
9	ND	69,18	22,88
15	ND	60,50	31,06
96	ND	36,27	52,79

*Porcentaje relativo obtenido por RP-HPLC; ND: No Detectable.

Tanto en la etapa de purificación de este nuevo derivado yodado por Cromatografía en Columna, como en ensayos preliminares de estabilidad empleando condiciones bien protegidas (estado sólido, ambiente de nitrógeno, 4 °C), se evidenció la inestabilidad del compuesto. A partir de estos resultados, se desestimó el desarrollo de estudios posteriores, considerando que ésta característica afectaría la eficiencia como agente FS en medios biológicos.

2.4.1.4- Reacciones de Metilación de *Neutral Red*

La metilación del compuesto NR se desarrolló empleando yoduro de metilo como agente alquilante. La evaluación de las reacciones se realizó mediante TLC y RP-HPLC evidenciando que en las condiciones experimentales ensayadas no se obtuvo ningún producto.

2.4.1.5- Identificación y Caracterización de Neutral Red y Neutral Red monobromado

Los compuestos pertenecientes a la Familia de las Azinas se evaluaron empleando las técnicas cromatográficas de TLC y RP-HPLC, determinando los parámetros correspondientes (**Tabla 2.6**).

Tabla 2.6: Análisis cromatográfico de *Neutral Red* y *Neutral Red* monobromado.

Compuesto	t_R (min., n=7)	R_f (n=7)
NR	4,72 ± 0,07	0,20 ± 0,05
NRBr	6,43 ± 0,08	0,70 ± 0,06

La caracterización espectrofotométrica UV-Visible se desarrolló en diversos solventes orgánicos de uso frecuente en el laboratorio. En todos los medios, se evidenció un desplazamiento batocrómico en las curvas espectrales de NRBr producido por el átomo de bromo, en comparación con el reactivo de partida, siendo en algunos solventes superior a 20 nm (**Tabla 2.7**). La evaluación de los compuestos en función de la concentración evidenció curvas espectrales completamente superponibles en acetonitrilo, diclorometano y cloroformo, en tanto que se observaron cambios marcados en metanol, etanol, isopropanol y acetona. Esto se atribuyó al fenómeno de agregación que experimentan ambos FS (**Capítulo 3: "Estudios de Agregación"**).

También se registraron los espectros de fluorescencia de ambos compuestos en etanol y DMF. Tanto NR como el nuevo derivado monobromado, presentaron una elevada fluorescencia, destacando que NRBr evidenció menor intensidad en ambos medios como consecuencia de la presencia de un átomo de bromo en la estructura molecular (**Figura 2.2**).

Tabla 2.7: Evaluación espectrofotométrica de *Neutral Red* y *Neutral Red* monobromado.

Solvente	Longitud de onda de máxima absorción (nm)	
	NR	NRBr
Acetona	525	545
Acetonitrilo	531	546
Diclorometano	517	560
Cloroformo	519	546
Metanol	533	541
Etanol	538	547
Isopropanol	537	547

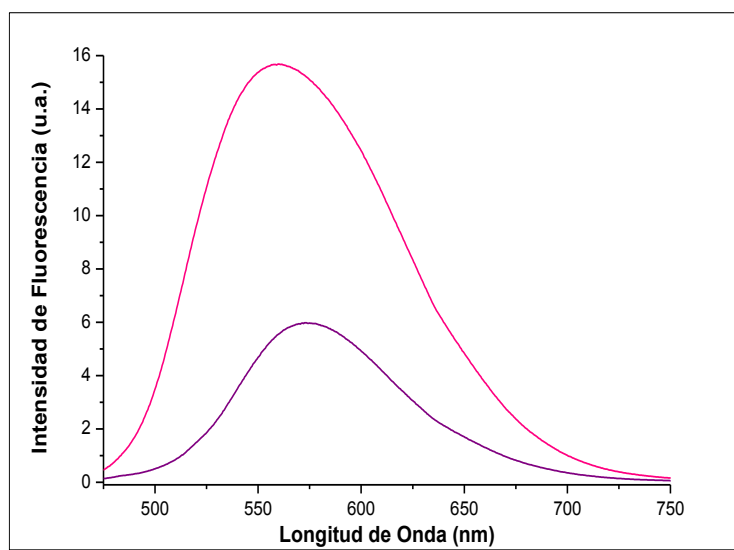


Figura 2.2: Espectros de Fluorescencia de *Neutral Red* (—) y *Neutral Red* monobromado (—) determinados en *N,N*-dimetilformamida.

Ambos compuestos FS, se caracterizaron empleando RMN, mediante el desarrollo de experimentos en una dimensión, RMN-¹H (**Anexo 1.1** y **Anexo 2.1**) y RMN-¹³C (**Anexo 1.2** y **Anexo 2.2**) y experimentos en dos dimensiones como

COSY¹ (Anexo 1.3 y Anexo 2.3), HSQC² (Anexo 1.4 y Anexo 2.4) y HMBC³ (Anexo 2.5). Además, se registraron los espectros de Masa de Alta Resolución ESI-micro QTOF (Anexo 1.5 y Anexo 2.6), ESI-MS, EI-MS (Anexo 1.6, Anexo 1.7, Anexo 2.7 y Anexo 2.8) y los espectros infrarrojos (Anexo 1.8 y Anexo 2.9).

Mediante el análisis de los espectros obtenidos por RMN se determinó que la sustitución por el átomo de bromo, se produjo en el carbono 3 de la estructura química (Esquema 2.1, Anexo 1.1 y Anexo 2.1). Es relevante destacar, que el átomo de halógeno generó un desapantallamiento del carbono 3, evidenciado mediante el desplazamiento hacia campos más bajos de la señal (97,984 ppm) en comparación con el reactivo de partida (93,050 ppm) (Anexo 1.2 y Anexo 2.2).

La caracterización desarrollada mediante FT-IR evidenció bandas entre 1500 y 1600 cm⁻¹ asignadas a los dobles enlaces de los átomos de carbono aromáticos, en tanto que las observadas entre 1000 y 1200 cm⁻¹ corresponden al enlace C-N. El nuevo derivado NRBr evidenció una banda a 671 cm⁻¹, la cual, si bien se encuentra en la zona de las huellas digitales del espectro, podría asignarse al enlace C-Br (Anexo 1.8 y Anexo 2.9). Por su parte, los espectros de masa permitieron evidenciar el ión molecular de NR y NRBr (Anexo 1.5, Anexo 1.6, Anexo 1.7, Anexo 2.6, Anexo 2.7 y Anexo 2.8).

2.4.2- Familia de las Oxazinas y Oxazonas

2.4.2.1- Evaluación Cromatográfica de Cresyl Violet Comercial

A fin de determinar la pureza de la muestra comercial de CV, se desarrollaron y aplicaron metodologías cromatográficas adecuadas por TLC y RP-HPLC. La detección en RP-HPLC se realizó a las λ_{\max} correspondientes a CV y CR, siendo estas 280 nm, 510 nm y 590 nm.

1- COSY: *CO*rrrelation *S*pectroscopy (Experimento homonuclear ¹H-¹H); 2- HSQC: *H*eteronuclear *S*ingle-*Q*uantum *C*orrelation (Experimento heteronuclear ¹H-¹³C); 3- HMBC: *H*eteronuclear *M*ultiple *B*ond *C*orrelation (Experimento heteronuclear ¹H-¹³C)

Se evaluaron diversas fases móviles, determinando como óptima para la separación y cuantificación de los compuestos, la mezcla metanol - solución de TEAP 83 mM 80:20 v/v. La muestra comercial está compuesta por un $51,9 \pm 1,4\%$ de CV y un $47,5 \pm 2,1\%$ de CR, determinados a $\lambda = 510$ nm. Por su parte, la elución en TLC evidenció claramente los principales componentes de la muestra comercial, CV y CR.

2.4.2.2- Separación de los componentes de la muestra comercial de Cresyl Violet

Los componentes contenidos en la muestra comercial de CV se aislaron mediante Cromatografía en Columna empleando como fase móvil una mezcla de cloroformo - metanol en diversas proporciones. El compuesto CR, fracción de color naranja, se separó utilizando la relación cloroformo - metanol (95:5 v/v), en tanto que el componente CV, fracción de color violeta, eluyó empleando metanol puro (Figura 2.3).

A)



B)



Figura 2.3: Cromatografía en Columna. A) CR puro; B) CV puro.

Una pequeña banda de color azul, correspondiente a un compuesto no identificado, se aisló empleando cloroformo - metanol (90:10 v/v), sin embargo, la caracterización de éste excede el objetivo de la presente evaluación.

La pureza relativa de las muestras de CR y CV separadas por Cromatografía en Columna, se determinaron aplicando la metodología desarrollada por RP-HPLC. El compuesto CV se aisló con una pureza > 98% y un porcentaje de recuperación > 97,4%, en tanto que el componente CR se determinó con una pureza > 99% y un porcentaje de recuperación > 83,7%. En la **Figura 2.4** se presentan los cromatogramas correspondientes a la muestra comercial y las fracciones puras de los principales componentes aislados.

Los componentes de la muestra comercial de CV se separaron de manera efectiva aplicando la Cromatografía en Columna. Cada Columna preparativa produjo, a partir de 1 mg de muestra comercial, 0,506 mg de CV y 0,397 mg de CR con un excelente grado de pureza.

2.4.2.3- Estudio sistemático de las condiciones de reacción: Aspectos generales

Las estructuras químicas de los compuestos CV y CR están activadas para la participación en reacciones de sustitución electrofílica aromática, ya que presentan grupos amino fuertemente activantes (**Esquema 2.2**). Las derivatizaciones se desarrollaron ensayando diversas matrices de reacción que involucraron diferentes solventes, tiempos de reacción y relaciones molares FS: bromo.

2.4.2.3.1- Reacciones de Bromación de Cresyl Violet

La evaluación por RP-HPLC de diferentes relaciones molares CV: bromo y tiempos de reacción, empleando ácido acético glacial como solvente, condujo a una compleja mezcla de compuestos bromados. Es relevante destacar, que tanto el incremento del tiempo de reacción, como la relación molar FS: bromo, produjo la precipitación de los componentes en la mezcla de reacción (**Tabla 2.8**).

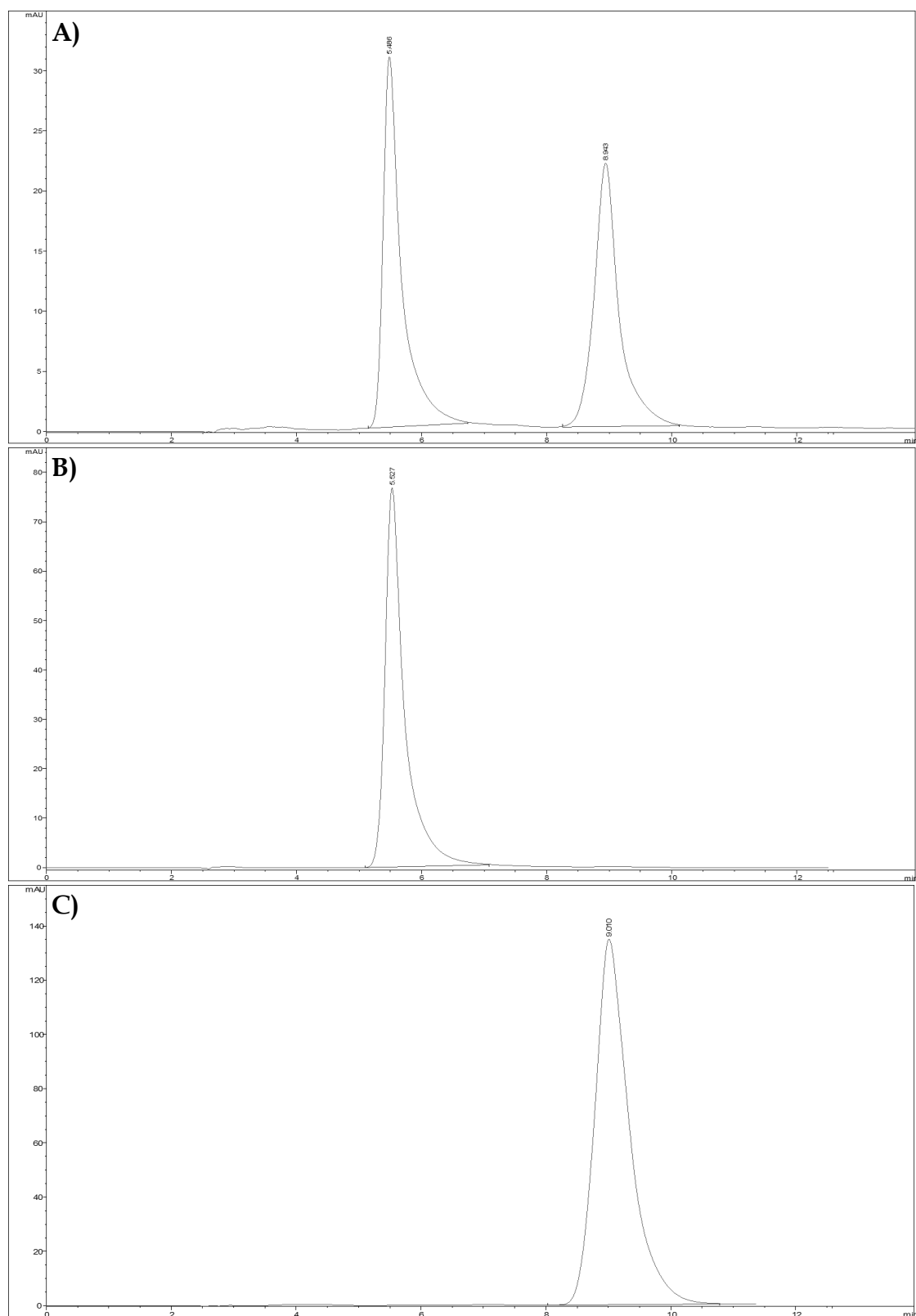


Figura 2.4: Cromatogramas RP-HPLC. **A)** Muestra comercial de *Cresyl Violet*; **B)** *Cresyl Violet*; **C)** *Cresyl Red*.

Tabla 2.8: Bromación de *Cresyl Violet* en ácido acético glacial.

Tiempo (min.)	Relación molar CV: Br ₂	Resultados (%)*			
		CV	CVBr	CVBr ₂	CVBr ₃
30	1:0	98,14	ND	ND	ND
	1:1,00	12,69	75,43	5,48	ND
	1:1,15	ND	77,28	11,96	6,41
	1:2,15	ND	25,11	63,00	9,49
	1:3,15	ND	13,89	72,74	11,04
	1:4,15	ND	13,87	72,14	10,65
	1:10,40	ND	2,41	84,64	10,54
60	1:0	100	ND	ND	ND
	1:1,00	ND	39,63	54,70	ND
	1:1,80	ND	10,94	77,43	9,61
	1:2,00	ND	ND	82,84	12,82
	1:3,00	ND	ND	69,47	25,82
	1:7,50	ND	ND	72,03	21,88

*Porcentaje relativo obtenido por RP-HPLC; ND: No Detectable.

Sin embargo, el desarrollo de la reacción de halogenación en metanol como solvente, empleando una relación molar CV: bromo (1:3,2) y luego de 30 minutos de reacción, permitió obtener de manera cuantitativa el derivado tribromado de CV (CVBr₃), siendo éstas las condiciones óptimas para la síntesis (**Figura 2.5**).

Es importante destacar, que la evaluación de diversos medios, tiempos de reacción y relaciones molares CV: bromo, no condujo a la obtención de los derivados monobromado (CVBr) y dibromado de CV (CVBr₂) en proporciones que justifiquen su aislamiento y permitan su posterior caracterización.

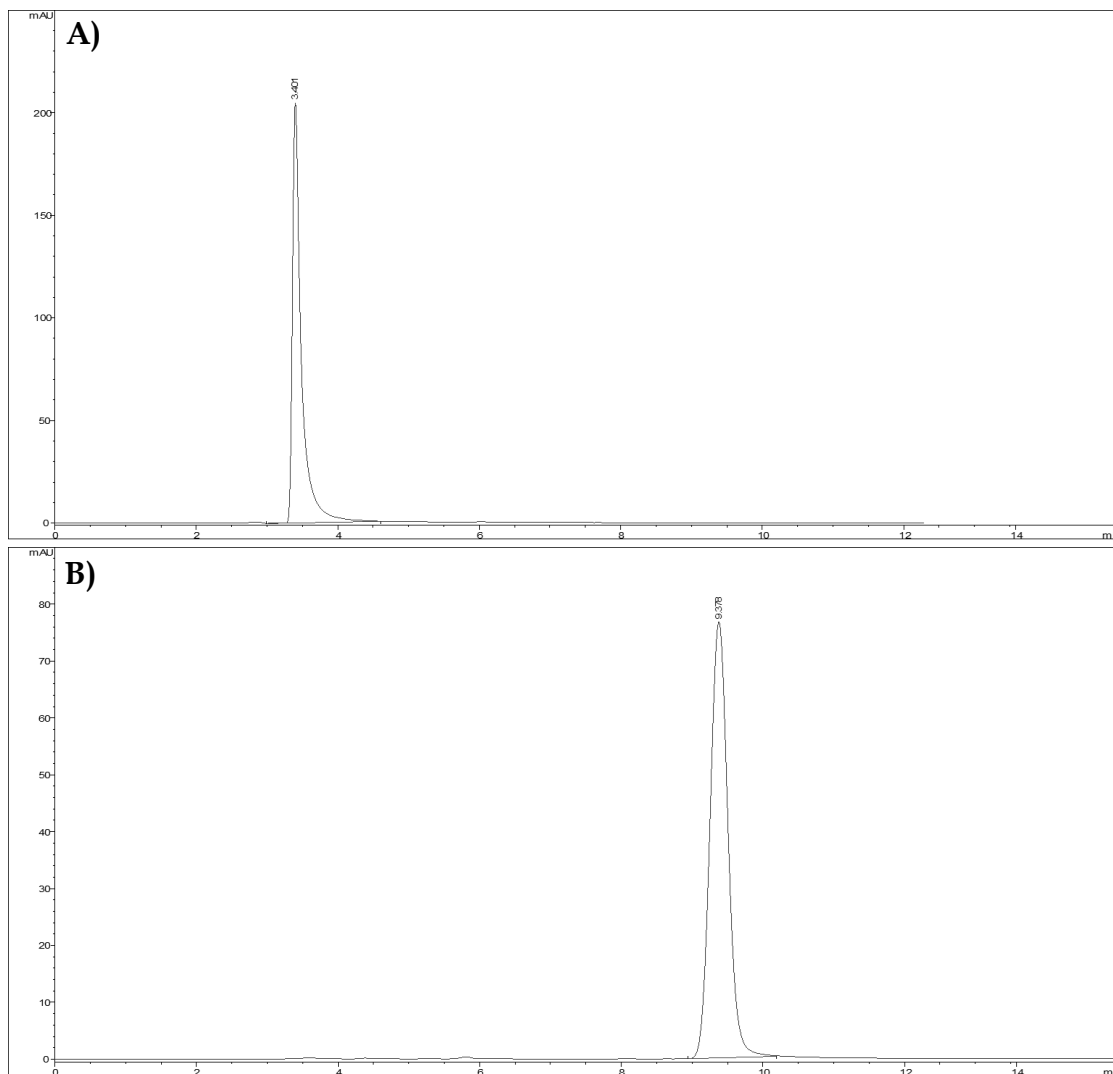


Figura 2.5: Cromatogramas RP-HPLC. Síntesis de *Cresyl Violet* tribromado. Relación *Cresyl Violet*: bromo. **A)** 1:0; **B)** 1:3,2.

2.4.2.3.2- Reacciones de Bromación de *Cresyl Red*

La evaluación por RP-HPLC de diversas relaciones molares CR: bromo y distintos tiempos de reacción, empleando ácido acético glacial como medio, condujo a una mezcla de compuestos bromados, aún en presencia de un exceso del reactivo halogenante. Es relevante destacar, que el incremento de la relación molar FS: bromo, produjo la precipitación de la mezcla de reacción (**Tabla 2.9**). También se evaluó como medio de reacción la mezcla cloroformo - metanol (7:3 v/v), ensayado una relación molar CR: bromo (1:3,2) y 30 minutos de reacción,

lo que condujo a una conversión cuantitativa del reactivo de partida que permitió la obtención del derivado tribromado (CRBr₃) (Figura 2.6).

Tabla 2.9: Bromación de *Cresyl Red*.

Condiciones: Ácido acético glacial; 30 minutos de reacción.

Relación molar CR: Br ₂	Resultados (%)*			
	CR	CRBr	CRBr ₂	CRBr ₃
1:0	94,52	ND	ND	ND
1:1	ND	75,49	17,37	2,49
1:2	ND	2,42	67,57	17,31
1:3	ND	3,54	62,02	29,39
1:4	ND	4,53	5,35	84,88
1:5	ND	4,39	20,82	70,60
1:6	ND	4,38	19,07	75,08

*Porcentaje relativo obtenido por RP-HPLC; ND: No Detectable.

Es importante destacar, que la evaluación de diversos medios, tiempos de reacción y relaciones molares CR: bromo, no permitieron la obtención de los derivados monobromado (CRBr) y dibromado de CR (CRBr₂) en proporciones que permitan y justifiquen su purificación y caracterización.

2.4.2.4- Identificación y Caracterización de *Cresyl Violet*, *Cresyl Violet tribromado*, *Cresyl Red* y *Cresyl Red tribromado*

Los compuestos pertenecientes a la Familia de las Oxazinas y Oxazonas se evaluaron aplicando las técnicas cromatográficas de TLC y RP-HPLC, determinando los parámetros correspondientes (Tabla 2.10). El análisis de los resultados obtenidos evidenció valores mayores de R_f y t_R para los nuevos derivados bromados con respecto a los reactivos de partida.

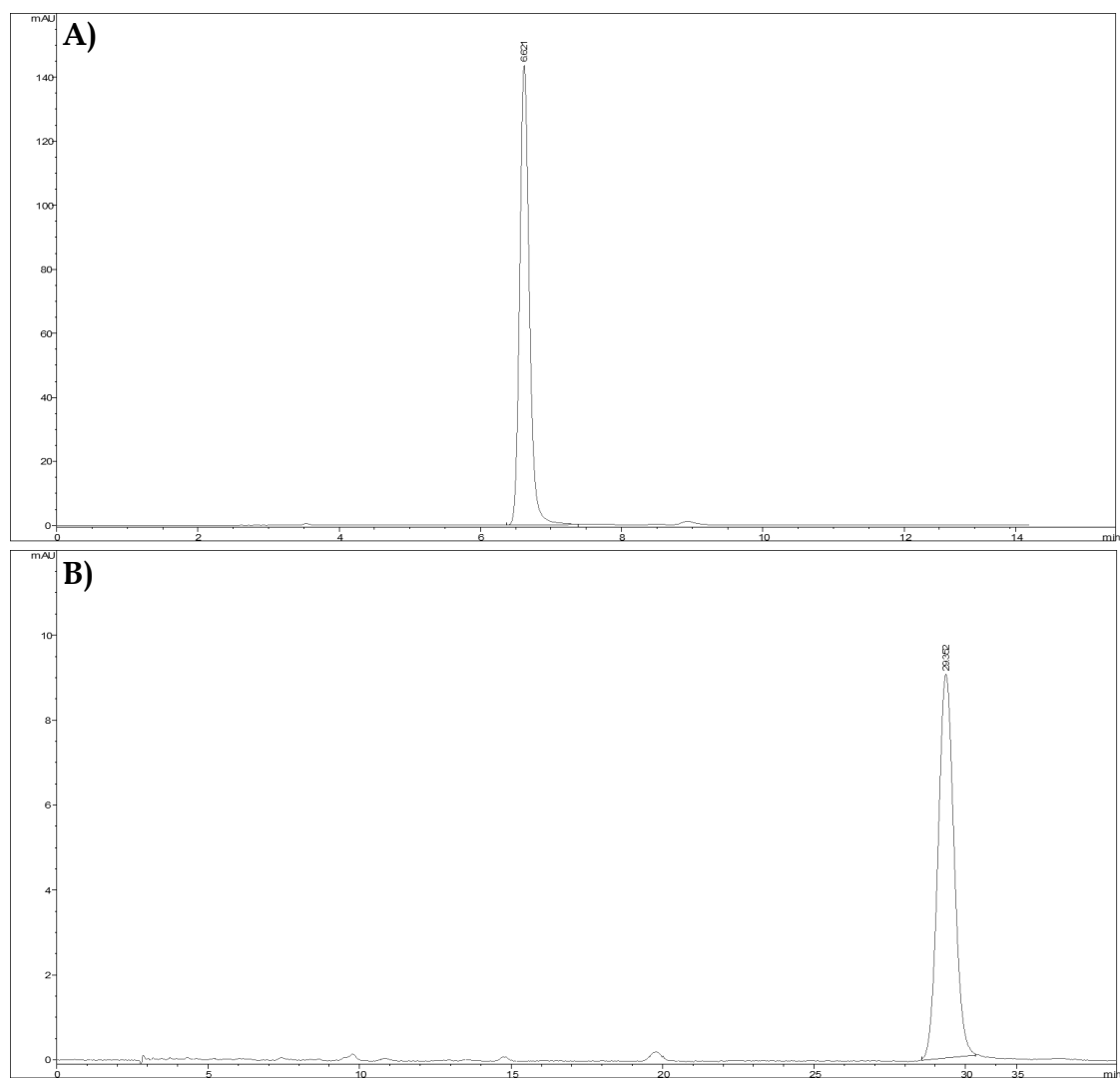


Figura 2.6: Cromatogramas RP-HPLC. Síntesis de *Cresyl Red* tribromado. Relación *Cresyl Red*: bromo. **A)** 1:0; **B)** 1:3,2.

Tabla 2.10: Análisis cromatográfico de los compuestos pertenecientes a la Familia de las Oxazinas y Oxazonas.

Compuesto	t_R (min, n=7)	R_f (n=7)
CV	$5,42 \pm 0,08$	$0,39 \pm 0,02$
CVBr ₃	$8,0 \pm 0,6$	$0,59 \pm 0,03$
CR	$8,9 \pm 0,2$	$0,84 \pm 0,02$
CRBr ₃	30 ± 2	$0,91 \pm 0,06$

La evaluación espectrofotométrica de una muestra de CV comercial y CV purificado por Cromatografía en Columna, empleando etanol como solvente, evidenció espectros casi indistinguibles (**Figura 2.7**). Por otra parte, los espectros de absorción de las muestras puras de CV y CR presentaron diferencias significativas, con λ_{\max} a 602 nm y 521 nm respectivamente.

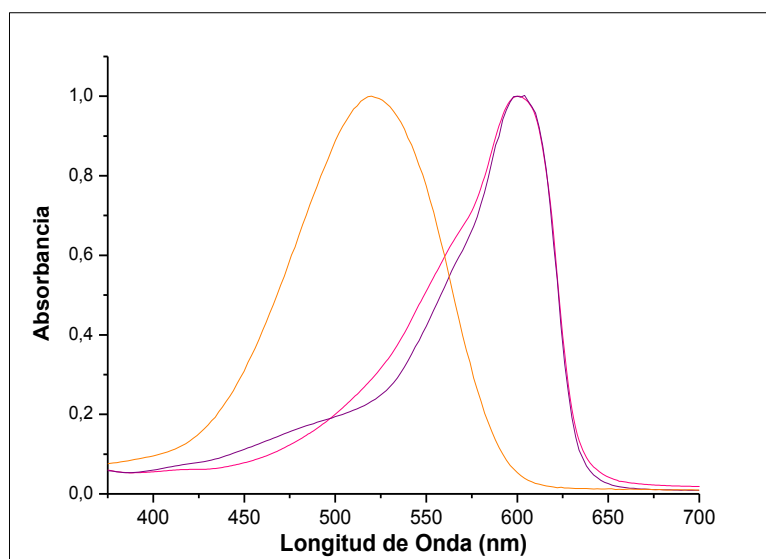


Figura 2.7: Espectro de absorción en etanol de *Cresyl Violet* comercial (—), *Cresyl Violet* puro (—) y *Cresyl Red* puro (—).

En la **Tabla 2.11** se resumen las λ_{\max} en diversos solventes, de los compuestos CV y CR puros y de la muestra comercial. Los efectos solvatocrómicos observados para CV y CR son altamente dependientes de la polaridad del solvente. La λ_{\max} de estos compuestos evidenció un incremento en el siguiente orden: diclorometano < acetonitrilo < acetona < metanol < etanol < isopropanol.

La caracterización espectrofotométrica de los nuevos derivados mediante UV-Visible permitió evidenciar un corrimiento hipsocrómico producido por la polibromación de las moléculas (**Tabla 2.12**).

Tabla 2.11: Longitud de onda de máxima absorción de *Cresyl Violet* comercial, *Cresyl Violet* y *Cresyl Red*.

Solvente	Longitud de onda de máxima absorción (nm)		
	CV comercial	CV*	CR*
Acetona	484	467	493
Acetonitrilo	481	463	489
Diclorometano	479	463	479
Metanol	593	594	517
Etanol	601	602	521
Isopropanol	612	611	524

*Pureza > 98 %, purificado por Cromatografía en Columna.

Tabla 2.12: Longitud de onda de máxima absorción de los compuestos pertenecientes a la Familia de las Oxazinas y Oxazonas.

Solvente	Longitud de onda de máxima absorción (nm)			
	CV*	CVBr ₃	CR*	CRBr ₃
Metanol	594	592	517	493
Etanol	602	594	521	498
DMF	482	474	512	498

*Pureza > 98 %, purificado por Cromatografía en Columna.

La misma tendencia del desplazamiento del máximo de absorción hacia menores longitudes de onda, se ha evidenciado para otros compuestos halogenados y podría explicarse considerando el impedimento estérico generado por los voluminosos átomos de bromo que causarían una torsión de los anillos en el plano, disminuyendo la resonancia de los electrones, y resultando finalmente en un corrimiento hipsocrómico del máximo de absorción del compuesto.⁴⁷⁻⁴⁹ Con relación a esto, se desarrolló una evaluación preliminar de la torsión de los anillos

correspondientes a las estructuras de CVBr_3 y CRBr_3 , la cual demostró no ser significativa ($\sim 0,01$ grados en un ángulo diedro) por lo que este efecto no presenta gran contribución.

La tendencia evidenciada, también podría explicarse considerando que los átomos de bromo presentan un efecto tomador de electrones de manera inductiva, lo cual conduciría a una disminución de la densidad electrónica de los anillos aromáticos y en consecuencia, la longitud de onda de máxima absorción del compuesto evidenciaría un desplazamiento hipsocrómico.^{50,51} En relación a esto, se desarrolló la evaluación de la superficie de los potenciales electrostáticos de los reactivos de partida y de los nuevos derivados empleando los programas AMBER y VMD (**Figura 2.8** y **Figura 2.9**). Los gráficos permiten evidenciar de manera relativa las densidades positivas y negativas de las diferentes moléculas. El color rojo indica la zona de mayor densidad de carga negativa, en tanto que el color azul representa la zona de menor densidad.

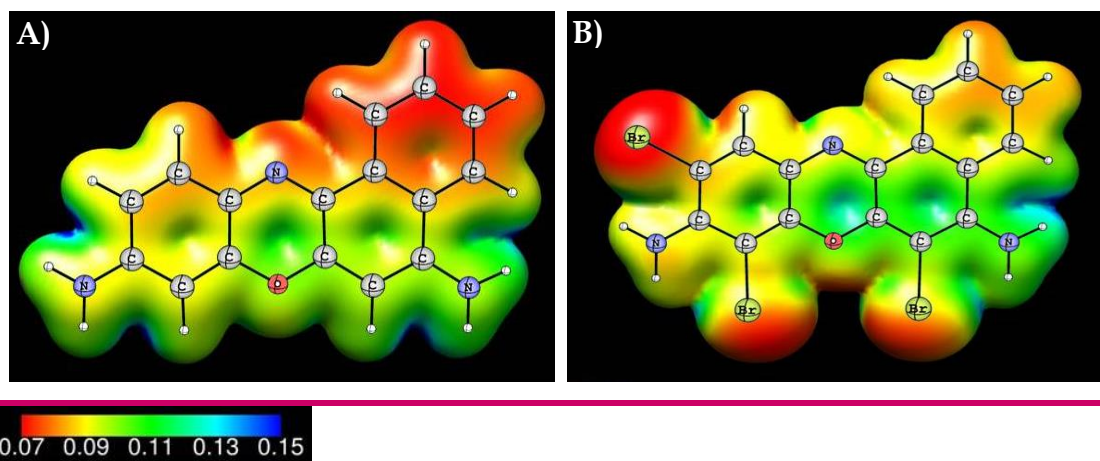


Figura 2.8: Potenciales electrostáticos calculados. **A)** CV, **B)** CVBr_3 .

La **Figura 2.8.A**, relativa al reactivo de partida CV, permite observar que la mayor densidad de carga se localiza principalmente en el anillo α unido al esqueleto tricíclico, mientras que en su análogo bromado (**Figura 2.8.B**), la mayor densidad se centra sobre los átomos de bromo, evidenciando que éstos actúan como

tomadores de electrones y por lo tanto los anillos presentan menor densidad electrónica en comparación con los correspondientes a CV.

Por su parte, las estructuras correspondientes a los compuestos de la Familia de las Oxazonas se presentan en la **Figura 2.9**. En la **Figura 2.9.A** se observa que la mayor densidad de carga en la molécula de CR está localizada principalmente en la región cercana al grupo carbonilo de la estructura. Esto se modifica en el nuevo derivado bromado (**Figura 2.9.B**), ya que la densidad electrónica en las zonas de los átomos de bromo se incrementa, en tanto que disminuye en el anillo α unido al esqueleto tricíclico, siendo esta zona más pobre en electrones en comparación con el reactivo de partida.

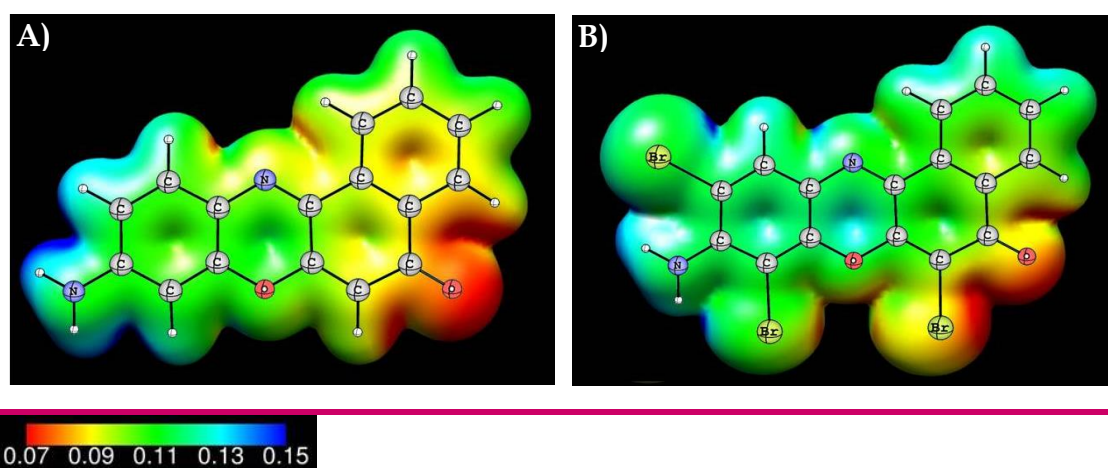


Figura 2.9: Potenciales electrostáticos calculados. A) CR, B) CRBr₃.

También se determinaron los espectros de fluorescencia en etanol y DMF de los compuestos CV, CR y sus respectivos derivados halogenados. En la **Figura 2.10** se presentan los espectros obtenidos para CV y el nuevo derivado CVBr₃ en DMF, siendo relevante destacar la elevada fluorescencia que presenta el precursor y la disminución de la misma, como consecuencia de la polibromación. Una tendencia similar se observó para los compuestos pertenecientes a la Familia de las Oxazonas, CR y el nuevo derivado CRBr₃ (**Figura 2.11**).

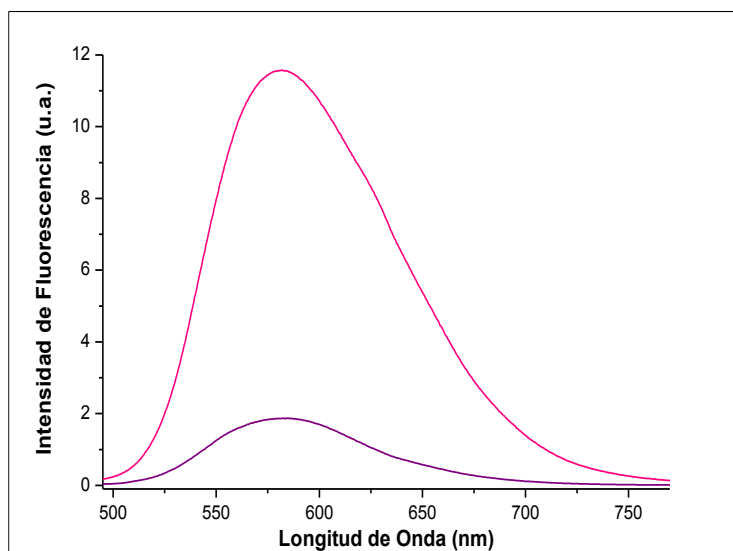


Figura 2.10: Espectros de Fluorescencia de *Cresyl Violet* (—) y *Cresyl Violet* tribromado (—) determinados en *N,N*-dimetilformamida.

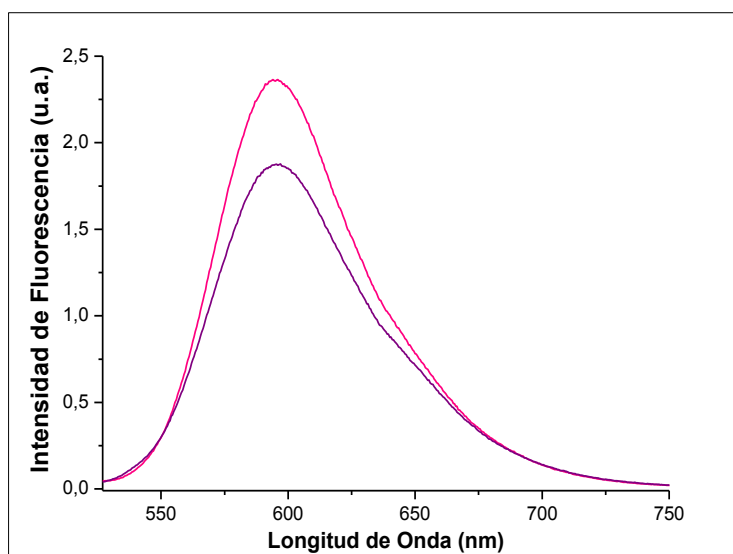


Figura 2.11: Espectros de Fluorescencia de *Cresyl Red* (—) y *Cresyl Red* tribromado (—) determinados en *N,N*-dimetilformamida.

Tanto los reactivos de partida, como los nuevos derivados polibromados pertenecientes a la Familia de las Oxazinas y Oxazonas se caracterizaron

empleando RMN, mediante el desarrollo de experimentos en una dimensión, RMN-¹H (**Anexo 3.1, Anexo 4.1, Anexo 4.2, Anexo 5.1, Anexo 6.1, Anexo 6.2 y Anexo 6.4**) y RMN-¹³C (**Anexo 3.2, Anexo 4.3 y Anexo 5.2**) y experimentos en dos dimensiones como COSY (**Anexo 3.3, Anexo 4.4, Anexo 4.5, Anexo 5.3 y Anexo 6.3**), HSQC (**Anexo 3.4, Anexo 4.6 y Anexo 5.4**), HMBC (**Anexo 3.5, Anexo 4.7 y Anexo 5.5**). Además, se registraron los espectros de Masa de Alta Resolución ESI-micro QTOF (**Anexo 3.6, Anexo 4.8, Anexo 5.6 y Anexo 6.5**), ESI-MS, EI-MS (**Anexo 3.7, Anexo 3.8, Anexo 4.9, Anexo 5.7 y Anexo 6.6**) y los espectros infrarrojos (**Anexo 3.9, Anexo 4.10, Anexo 5.8 y Anexo 6.7**).

A partir de los espectros de RMN-¹H registrados para ambos compuestos polibromados, se confirmó que la sustitución por los 3 átomos de bromo se localizó en las posiciones 1, 3 y 11 de las correspondientes estructuras (**Esquema 2.2, Anexo 3.1, Anexo 4.1, Anexo 4.2, Anexo 5.1, Anexo 6.1, Anexo 6.2 y Anexo 6.4**).

El análisis y comparación de los espectros de RMN-¹³C correspondientes a los reactivos de partida, CV y CR, indica como diferencia principal el corrimiento químico del átomo de carbono 12 (**Esquema 2.2, Anexo 3.2 y Anexo 5.2**). Esto se atribuye a que el grupo carbonilo presente en la molécula de CR produce un desapantallamiento importante, razón por la cual, el átomo de carbono se evidencia a menores campos en comparación con el análogo presente en la estructura química de CV.

La caracterización desarrollada por FT-IT evidenció bandas entre 1100 y 1250 cm⁻¹ correspondientes a los enlaces C-H y N-H. La banda observada a ~ 1350 cm⁻¹ se atribuyó a la tensión C-N y a la flexión C-N-H, en tanto que la evidenciada a 1460 cm⁻¹ a la flexión NH₂. Es relevante destacar que los espectros obtenidos para los compuestos CR y CRBr₃ mostraron la banda característica a ~ 1740 cm⁻¹, atribuida al grupo C=O presente en la estructura (**Anexo 3.9, Anexo 4.10, Anexo 5.8 y Anexo 6.7**). Por su parte, los espectros de masa permitieron evidenciar el ión molecular de todos los compuestos involucrados (**Anexo 3.6, Anexo 4.8, Anexo 5.6 y Anexo 6.5**).

2.5- CONCLUSIONES

Las diversas actividades desarrolladas permitieron determinar las condiciones óptimas de separación y purificación de los reactivos de partida CV y CR, obteniendo los mismos con un alto grado de pureza y muy buenos rendimientos. Mediante diversos estudios sistemáticos de las condiciones de reacción, se sintetizaron con excelente rendimiento y pureza, tres nuevos derivados bromados, NRBr, CVBr₃ y CRBr₃.

Tanto los reactivos de partida como los nuevos agentes FS obtenidos, se caracterizaron inequívocamente mediante las técnicas de rutina, aplicando RMN (experimentos en una y dos dimensiones), Espectrometría de Masa de Alta Resolución, ESI-MS, EI-MS y FT-IR. También se establecieron las condiciones óptimas para el análisis de todos los compuestos mediante TLC y RP-HPLC. Además, como parte del análisis de los compuestos, los mismos se evaluaron espectrofotométricamente en una gran diversidad de solventes.

Tanto los prototipos empleados como los nuevos derivados sintetizados, podrían presentar mejores propiedades físicas, químicas y terapéuticas que los líderes actuales. A partir de éstos, se seleccionará el compuesto más prometedor con potencial aplicación en TFD e IFD, contribuyendo de manera sólida al avance de estas novedosas alternativas terapéuticas.

2.6- BIBLIOGRAFÍA

- [1]- M. Wainwright, K. Meegan, C. Loughran. Phenothiazinium photosensitisers IX. Tetra- and pentacyclic derivatives as photoantimicrobial agents. *Dyes Pigments*. 2011; 91 (1): 1-5.
- [2]- D. Silva Pellosi, B. Martins Estevão, J. Semensato, D. Severino, M.S. Baptista, M.J. Politi, N. Hioka, W. Caetano. Photophysical properties and interactions of xanthene dyes in aqueous micelles. *J Photochem Photobiol A*. 2012; 247: 8-15.
- [3]- M. Wainwright, R.M. Giddens. Phenothiazinium photosensitisers: choices in synthesis and application. *Dyes Pigments*. 2003; 57 (3): 245-257.

- [4]- M. Wainwright, H. Mohr, W.H. Walker. Phenothiazinium derivatives for pathogen inactivation in blood products. *J Photochem Photobiol B*. 2007; 86 (1): 45-58.
- [5]- F. Gao, X. Wang, S. Wang, M. Liu, X. Liu, X. Ye, H. Li. Bromine-substituted *p*-nitrostilbene derivatives: synthesis, crystal structural studies, photoluminescence and the heavy atom effect on the singlet oxygen generation by two-photon absorption. *Tetrahedron*. 2013; 69 (13): 2720-2732.
- [6]- C. Tang, P. Hu, E. Ma, M. Huang, Q. Zheng. Heavy atom enhanced generation of singlet oxygen in novel indenofluorene-based two-photon absorbing chromophores for photodynamic therapy. *Dyes Pigments*. 2015; 117: 7-15.
- [7]- X. Chen, Y. Li, A. Wang, L. Zhou, S. Lu, J. Zhou, Y. Lin, S. Wei. Protonation salt derivative with heavy-atom effect on phthalocyanine for enhanced in vitro photodynamic therapy. *Dyes Pigments*. 2015; 114: 93-104.
- [8]- L. Zhou, X. Ge, J. Liu, J. Zhou, S. Wei, F. Li, J. Shen. Internal heavy atom effect of Au(III) and Pt(IV) on hypocrellin A for enhanced in vitro photodynamic therapy of cancer. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013; 23 (19): 5317-5324.
- [9]- M. Wainwright. The development of phenothiazinium photosensitisers. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2005; 2 (4): 263-272.
- [10]- A. Gorman, J. Killoran, C. O'Shea, T. Kenna, W.M. Gallagher, D.F. O'Shea. In vitro demonstration of the heavy-atom effect for photodynamic therapy. *J Am Chem Soc*. 2004; 126 (34): 10619-10631.
- [11]- C.W. Lin, J.R. Shulok, Y.K. Wong, C.F. Schanbacher, L. Cincotta, J.W. Foley. Photosensitization, uptake and retention of phenoxazine Nile Blue derivatives in human bladder carcinoma cells. *Cancer Research*. 1991; 51: 1109-1116.
- [12]- C.R. Shea, N. Chen, J. Wimberly, T. Hasan. Rhodamine dyes as potential agents for photochemotherapy of cancer in human bladder carcinoma cells. *Cancer Research*. 1989; 49: 3961-3965.
- [13]- A. Kamkaew, S.H. Lim, H.B. Lee, L.V. Kiew, L.Y. Chung, K. Burgess. BODIPY dyes in photodynamic therapy. *Chem Soc Rev*. 2013; 42 (1): 77-88.

- [14]- M. Wainwright, D.A. Phoenix, L. Rice, S.M. Burrow, J. Waring. Increased cytotoxicity and phototoxicity in the methylene blue series via chromophore methylation. *J Photochem Photobiol B*. 1997; 40 (3): 233-239.
- [15]- D.A. Phoenix, F. Harris. Phenothiazinium-based photosensitizers: antibacterials of the future. *Trends Mol Med*. 2003; 9 (7): 283-285.
- [16]- L.S. Pierson, E.A. Pierson. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010; 86 (6):1659-1670.
- [17]- A. Cimmino, A. Evidente, V. Mathieu, A. Andolfi, F. Lefranc, A. Kornienko, R. Kiss. Phenazines and cancer. *Nat Prod Rep*. 2012; 29: 487-501.
- [18]- M.K. Singh, H. Pal, A.C. Bhasikuttan, A.V. Sapre. Dual solvatocromism of Neutral Red. *Photochem Photobiol*. 1998; 68 (1): 32-38.
- [19]- M.K. Singh, H. Pal, A.C. Bhasikuttan, A.V. Sapre. Photophysical properties of the cationic form of Neutral Red. *Photochem Photobiol*. 1999; 69 (5): 529-535.
- [20]- C. Sousa, T. Sá e Melo, M. Gèze, J.M. Gaullier, J.C. Mazière, R. Santus. Solvent polarity and pH effects on the spectroscopic properties on Neutral Red: application to lysosomal microenvironment probing in living cells. *Photochem Photobiol*. 1996; 63 (5): 601-607.
- [21]- S. Basu, S. Panigrahi, S. Praharaj, S.K. Ghosh, S. Pande, S. Jana, A. Pal, T. Pal. Solvent effect on the electronic spectra of azine dyes under alkaline condition. *J Phys Chem A*. 2007; 111 (4): 578-583.
- [22]- B.B. Fischer, A. Krieger-Liszkay, R.I.L. Eggen. Oxidative stress induced by the photosensitizers neutral red (type I) or rose bengal (type II) in the light causes different molecular responses in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Science*. 2005; 168 (3): 747-759.
- [23]- D.A. Phoenix, Z. Sayed, S. Hussain, F. Harris, M. Wainwright. The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Mic*. 2003; 39 (1): 17-22.
- [24]- G. Yen, E. Simon. Photosensitization of herpes simplex virus type 1 with Neutral Red. *J Gen Virol*. 1978; 41: 273-281.

- [25]- M. Wainwright. Photoinactivation of viruses. *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3 (5): 406-411.
- [26]- C.M. Cassidy, M.M. Tunney, P.A. McCarron, R.F. Donnelly. Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: From benchtop to clinical practice. *J Photochem Photobiol B.* 2009; 95 (2): 71-80.
- [27]- T.W. Ghang, N. Fiumara, L. Weinstein. Genital herpes: treatment with methylene blue and light exposure. *Pharmacol treatment.* 1975; 14 (1): 69-71.
- [28]- J.P. Tardivo, M. Wainwright, M.S. Baptista. Local clinical phototreatment of herpes infection in São Paulo. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2012; 9 (2): 118-121.
- [29]- M. Wainwright. Local treatment of viral disease using photodynamic therapy. *Int J Antimicrob Agents.* 2003; 21 (6): 510-520.
- [30]- R.J. Nieckarz, J. Oomens, G. Berden, P. Sagulenko, R. Zenobi. Infrared multiple photon dissociation (IRMPD) spectroscopy of oxazine dyes. *Phys Chem Chem Phys.* 2013; 15: 5049-5056.
- [31]- A. Jafari, A. Ghanadzadeh, H. Tajalli, M. Yeganeh, M. Moghadam. Electronic absorption spectra of cresyl violet acetate in anisotropic and isotropic solvents. *Spectrochim Acta A.* 2007; 66 (3): 717-725.
- [32]- D. Hazafy, M.V. Salvia, A. Mills, M.G. Hutchings, M.P. Evstigneev, J.A. Parkinson. NMR analysis of Nile Blue (C. I. Basic Blue 12) and Thionine (C. I. 52000) in solution. *Dyes Pigments.* 2011; 88: 315-325.
- [33]- D.I. Kreller, P.V. Kamat. Photochemistry of sensitizing dyes. Spectroscopic and redox properties of Cresyl Violet. *J Phys Chem.* 1991; 95 (11): 4406-4410.
- [34]- E.M. Costi, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito. Determination of cationic surfactants in pharmaceuticals based on competitive aggregation in ternary amphiphile mixtures. *Anal Chim Acta.* 2006; 577 (2): 257-263.
- [35]- V.B. Gawandi, S.N. Guha, K.I. Priyadarsini, H. Mohan. Steady-state and time-resolved studies on spectral and redox properties of dye-surfactant interactions. *J Colloid Interface Sci.* 2001; 242 (1): 220-229.
- [36]- D. Liu, P.V. Kamat. Picosecond dynamics of Cresyl Violet H-aggregates adsorbed on SiO₂ and SnO₂ nanocrystallites. *J Chem Phys.* 1996; 105 (3): 965-970.

- [37]- S.J. Isak, E.M. Eyring. Cresyl violet chemistry and photophysics in various solvents and micelles. *J Photochem Photobiol A*. 1992; 64 (3): 343-358.
- [38]- S.J. Isak, E.M. Eyring. Fluorescence quantum yield of cresyl violet in methanol and water as a function of concentration. *J Phys Chem*. 1992; 96 (4): 1738-1742.
- [39]- F.J. Green. A status report on biological stains. *Aldrichimica acta*. 1978; 11(1): 3-6.
- [40]- G. Broncová, T.V. Shishkanova, P. Matějka, R. Volf, V. Král. Citrate selectivity of poly(neutral red) electropolymerized films. *Anal Chim Acta*. 2004; 511 (2):197-205.
- [41]- D.D. Schlereth, A.A. Karyakin. Electropolymerization of phenothiazine, phenoxazine and phenazine derivatives: characterization of the polymers by UV-visible difference spectroelectrochemistry and Fourier transform IR spectroscopy. *J Electroanal Chem*. 1995; 395 (1-2): 221-32.
- [42]- L.K. Pannell, E.A. Sokoloski, H.M. Fales. Californium-252 plasma desorption cationic, anionic and neutral dyes. *Anal Chem*. 1985; 57 (6): 1060-1067.
- [43]- E. Vogel, A. Gbureck, W. Kiefer. Vibrational spectroscopic studies on the dyes cresyl violet and coumarin 152. *J Mol Struct*. 2000; 550-551: 177-190.
- [44]- A. Raffaelli, S. Pucci, I. Desideri, C.R. Bellina, R. Bianchi, P. Salvadori. Investigation on the iodination reaction of methylene blue by liquid chromatography-mass spectrometry with ionspray ionization. *J Chromatogr A*. 1999; 854 (1-2): 57-67.
- [45]- S. Adimurthy, G. Ramachandraiah, P.K. Ghosh, A.V. Bedekar. A new, environment friendly protocol for iodination of electron-rich aromatic compounds. *Tetrahedron Lett*. 2003; 44 (27): 5099-5101.
- [46]- A.K. Mohanakrishnan, C. Prakash N. Ramesh. A simple iodination protocol via in situ generated ICl using NaI/FeCl₃. *Tetrahedron*. 2006; 62 (14): 3242-3247.
- [47]- K.N. Solovyov, E.A. Borisevich. Intramolecular heavy-atom effect in the photophysics of organic molecules. *Phys - Usp*. 2005; 48 (3): 231-253.
- [48]- H. Morrisont, T. Mohammad, R. Kurukulasuriya. Photobiological properties of methylene violet. *Photochem Photobiol*. 1997; 66 (2): 245-252.

[49]- S.A. Ahmeda, A.A. Abdel-Wahab, H. Dürr. Steric substituent effects of new photochromic tetrahydroindolizines leading to tunable photophysical behavior of the colored betaines. *J Photochem Photobiol A*. 2003; 154: 131-144.

[50]- M.S. Masoud, A.E. Ali, M.A. Shaker, M.A. Ghani. Solvent and substituent effects on spectroscopical changes of some diazoaminobenzene derivatives. *Spectrochim Acta A*. 2005; 61 (13-14): 3102-3107.

[51]- R.O. Loutfy, J.H. Sharp. Electronic properties of furanquinone pigments. Correlation between photosensitivity and emissivity. *J Phys Chem*. 1979; 83 (9): 1208-1212.



CAPÍTULO 3
ESTUDIOS DE AGREGACIÓN



ÍNDICE CAPÍTULO 3

3.1- INTRODUCCIÓN.....	99
3.2- OBJETIVOS.....	102
3.3- MATERIALES Y MÉTODOS	103
3.3.1- Materiales y Procedimiento General.....	103
3.3.2- Equipamiento.....	104
3.3.2.1- Familia de las Azinas.....	104
3.3.2.2- Familia de las Oxazinas y Oxazonas.....	104
3.3.3- Detalles Computacionales.....	104
3.4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	105
3.4.1- Familia de las Azinas.....	105
3.4.1.1- Evaluación de la agregación en <i>N,N</i> -dimetilformamida, dimetilfulfóxido y polietilenglicol 400.....	105
3.4.1.2- Evaluación de la agregación en etanol, solución acuosa y mezclas hidroalcohólicas.....	109
3.4.1.3- Evaluación de la agregación en soluciones buffer.....	121
3.4.1.4- Desarrollo de cálculos teóricos.....	124
3.4.2- Familia de las Oxazinas y Oxazonas.....	127
3.4.2.1- Evaluación de la agregación en <i>N,N</i> -dimetilformamida, etanol, polietilenglicol 400 y solución acuosa.....	127

3.4.2.2- Desarrollo de cálculos teóricos	137
3.5- CONCLUSIONES	138
Agradecimientos	139
3.6- BIBLIOGRAFÍA	139

3.1- INTRODUCCIÓN

El empleo de compuestos coloreados en el área biomédica ha experimentado un notable crecimiento en los últimos años y es probablemente, en la actualidad, una de las áreas de mayor expansión.¹⁻³ Una de las propiedades más importantes e interesantes es la formación de agregados, por lo cual, en las últimas décadas, los compuestos coloreados han sido objeto de numerosas investigaciones.^{4,5} El fenómeno de agregación de las moléculas en solución, es importante con respecto a la organización de las subunidades en las grandes estructuras, ya que presenta consecuencias fundamentales en aplicaciones tan diversas como tecnología fotográfica, láseres sintonizables y fotomedicina.⁵⁻⁸

La agregación de pequeñas moléculas orgánicas para formar grandes agregados es de amplio interés en química, física y biología. Los agregados moleculares de diversos compuestos han sido estudiados como fotoconductores orgánicos, marcadores para los sistemas de membranas biológicas y materiales con propiedades adecuadas para dispositivos ópticos.^{7,9} La formación de agregados en soluciones acuosas concentradas, se sugirió para explicar las desviaciones sustanciales de la Ley de Lambert-Beer, evidenciada por moléculas orgánicas altamente coloreadas tales como MB, *Crystal Violet*, ciertas Cianinas y Xantenos.^{5,8,10}

Es ampliamente conocido que los colorantes iónicos tienden a agregarse aún en soluciones diluidas, conduciendo a la formación de dímeros y en ciertos casos agregados de orden superior.^{5,10-13} Esta asociación molecular se encuentra fuertemente afectada por numerosos parámetros, tales como la estructura y concentración del compuesto, temperatura, fuerza iónica del medio y naturaleza del solvente.^{5,6,8,10-14} En general, se incrementa con un aumento de la concentración de colorante o fuerza iónica y disminuye con el aumento de la temperatura o la adición de solventes orgánicos. Además, la incorporación de grupos solubilizantes iónicos a la estructura molecular conduce a la disminución de la agregación, en tanto que la inclusión de cadenas alquílicas la incrementan como consecuencia de la mayor interacción hidrofóbica en solución.^{5,6,8,10-12,14} La

mayoría de los compuestos que presentan una elevada agregación, son estructuras planas y de naturaleza catiónica.^{10,13,15,16}

En general, los compuestos coloreados se agregan más fuertemente en agua que en solventes orgánicos y aumentan su estado de agregación en soluciones de alta fuerza iónica. La presencia de alcohol o glicerol en una solución acuosa, previene o disminuye la formación de agregados y esto se ha explicado, en términos de la influencia de la constante dieléctrica sobre la repulsión electrostática entre las moléculas.^{5,8}

Estudios de agregación han indicado que moléculas catiónicas altamente coloreadas, a pesar de la repulsión que experimentan debido a las cargas que presentan, se agregan dando origen a dímeros, trímeros e incluso agregados superiores, presentando una conformación de las cargas separadas espacialmente.¹⁷ Se han propuesto diversos mecanismos para explicar las fuerzas que mantienen a los colorantes iónicos unidos en solución. Estos incluyen fuerzas de tipo van der Waals, fuerzas de dispersión de London, enlaces de hidrógeno intermolecular, enlaces de hidrógeno con el solvente y la coordinación con iones metálicos.^{5,8,17} En un sistema compuesto/solvente, más de un mecanismo puede ser importante. Al evaluar por ejemplo, *Fluorescein* y sus derivados halogenados (Familia de los Xantenos), se evidencia que la naturaleza de la fuerza motriz de la agregación se modifica con el grado de halogenación. El enlace de hidrógeno es el principal responsable de la dimerización de *Fluorescein*, en tanto que la fuerza impulsora para sus derivados halogenados, es una combinación de enlaces de hidrógeno y fuerzas hidrofóbicas. La participación de estas últimas, se incrementa con el aumento de la sustitución por átomos de halógenos y con la presencia de halógenos más polarizables.^{8,17}

Las interacciones entre las moléculas en solución conducen a grandes desplazamientos y cambios espectrales. El incremento de la concentración de compuesto produce al menos una nueva banda de absorción que se encuentra a menores o mayores longitudes de onda en comparación con la curva espectral del monómero.^{10,15,18} Este comportamiento se encuentra fuertemente relacionado con la geometría de la disposición molecular del agregado.^{4,18}

La Teoría del Excitón Molecular de acoplamiento dipolo-dipolo es una herramienta teórica bien aceptada, por la cual es posible analizar los diferentes tipos de agregados.^{8,13} Este modelo predice que los agregados paralelos (conocidos como agregados tipo H) presentan una banda de absorción a menores longitudes de onda en comparación con el monómero (desplazada hacia el azul del espectro electromagnético), en tanto que los agregados cabeza-cola (agregados tipo J) se caracterizan por una banda de absorción a mayores longitudes de onda, es decir, desplazada hacia el rojo del espectro electromagnético^{5,8,13,15,18} (**Figura 3.1**). Además, los dímeros que presentan geometrías intermedias dan lugar a la división de la banda espectral (división Davydov), posiblemente como consecuencia de que las unidades de monómero se encuentran dispuestas de modo oblicuo en el plano molecular, donde cada molécula se encuentra orientada con respecto a otra en un ángulo θ .^{4,8,13,18}

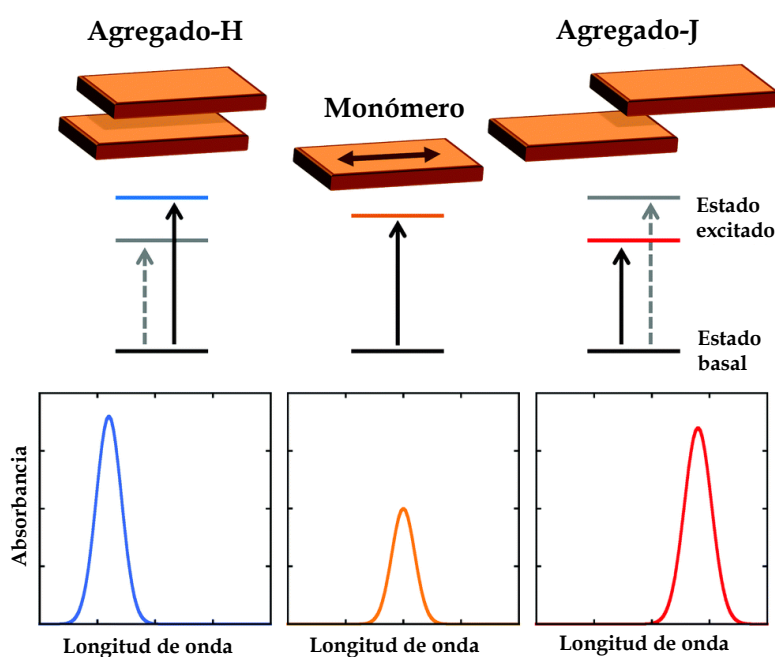


Figura 3.1: Modelos que representan las disposiciones de los monómeros de las moléculas en diferentes agregados y el desplazamiento espectral que producen.

La formación de agregados en solución conduce a cambios significativos en los espectros de absorción y emisión, por lo que decae la respuesta fotoquímica.^{5,19,20} Se ha reportado un incremento de la disipación de la energía no radiativa, lo que produce la disminución de los rendimientos cuánticos de los estados excitados y por ende, de la generación de agentes citotóxicos.²¹⁻²⁶ Por lo tanto, la formación de agregados moleculares es uno de los factores determinantes, ya que puede dificultar la eficacia del agente FS *in vivo* al disminuir la biodisponibilidad y limitar la capacidad de absorber luz.^{26,27}

Dado que la formación de agregados produce un impacto significativo en las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de los compuestos, desempeñando un rol importante en las aplicaciones terapéuticas fotodinámicas, es importante abordar la información detallada sobre la dinámica de la agregación de los FS y su dependencia con las características del medio.^{5,8,10,23,24,26}

Se ha reportado que los métodos espectroscópicos son altamente sensibles y apropiados para el estudio de los equilibrios químicos en solución. La espectroscopia de absorción UV-Visible es uno de los métodos más adecuados para el estudio cuantitativo del fenómeno de agregación en función de la concentración del compuesto.^{5,11,12,13,28}

3.2- OBJETIVOS

Debido a que la formación de agregados en solución modifica diversas propiedades de una molécula, se desarrolló un estudio profundo del fenómeno de agregación de compuestos pertenecientes a las Familias de las Azinas, Oxazinas y Oxazonas en diferentes medios. Esta evaluación es fundamental, ya que la formación de agregados impacta en la capacidad de los compuestos para actuar como FS, alterando por lo tanto, la actividad fotodinámica que ellos presenten.

Además, se desarrollaron cálculos teóricos con el fin de determinar el máximo de absorción de las especies monoméricas de los diferentes FS, comparando estos valores con los datos obtenidos experimentalmente.

3.3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1- Materiales y Procedimiento General

Neutral Red chloride (NR, 3-amino-7-dimetilamino-2-metil fenazina hidrocloreto; N7005-5G; lote N° 017K1193) y *Cresyl Violet acetate* (CV, 9-amino-5-imino-5H-benzo[*a*]fenoxazina; C1791-1G, lote N° 093K3731) se adquirieron a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). NR se empleó sin previa purificación, confirmando su pureza > 98% por RP-HPLC. CV se purificó mediante la metodología previamente descrita en la **Sección 2.4.2.2: "Separación de los componentes de la muestra comercial de Cresyl Violet"**. El compuesto NRBr se sintetizó mediante el procedimiento detallado en la **Sección 2.3.2.4: "Síntesis y caracterización de derivados de Azinas"** en tanto que los compuestos CVBr₃ y CRBr₃ se obtuvieron siguiendo la metodología de la **Sección 2.3.3.3: "Síntesis y caracterización de derivados de Oxazinas y Oxazonas"**.

Las soluciones *buffer* se prepararon empleando ácido clorhídrico (37%)/cloruro de potasio (pH=1,2) y fosfato diácido de potasio/hidróxido de sodio (pH=5,8 y 7,4). La fuerza iónica de las soluciones se ajustó a 0,5 M empleando cloruro de sodio como electrolito soporte.

Se emplearon solventes grado analítico, adquiridos a Cicarelli, Sintorgan y Anedra, sin purificación previa. Los compuestos químicos se obtuvieron comercialmente (Cicarelli, Sintorgan, Anedra) con la mayor pureza disponible en el mercado. Las soluciones acuosas se prepararon empleando agua ultrapura del sistema de purificación de agua Milli-Q® (Millipore Corporation, USA).

Las soluciones madre de los compuestos se prepararon en el momento de realizar las determinaciones y se diluyeron apropiadamente con el mismo medio. Todos los experimentos se desarrollaron a temperatura ambiente y por duplicado, obteniendo resultados consistentes.

3.3.2- Equipamiento

3.3.2.1- Familia de las Azinas

Los espectros de absorción se desarrollaron empleando un espectrofotómetro Evolution 300 y celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Las curvas espectrales se registraron entre 200 y 700 nm como una función de la concentración de compuesto (10^{-7} M - 10^{-4} M) en DMF, dimetilfulfóxido (DMSO), polietilenglicol 400 (PEG 400), etanol, solución acuosa, mezclas hidroalcohólicas y soluciones *buffer*. El pH de las soluciones *buffer* se determinó empleando un pH-metro CRISON GLP 21 con electrodo de vidrio combinado.

3.3.2.2- Familia de las Oxazinas y Oxazonas

Los espectros de absorción se registraron en un espectrofotómetro UV-Visible Varian Cary 50 conc y un UV-Visible Shimadzu UV-2101 PC empleando celdas de cuarzo de 1 cm y 5 cm de paso óptico, respectivamente.

La agregación de los compuestos se evaluó mediante el análisis de las curvas espectrales entre 200 y 800 nm en DMF y etanol, en función de la concentración de compuesto (10^{-6} a 10^{-4} M). Además, se evaluaron las curvas espectrales de CV en solución acuosa y en la combinación de agua: PEG 400 (75:25 v/v).

3.3.3- Detalles Computacionales

Los cálculos teóricos informados se desarrollaron empleando el pack de programas GAUSSIAN 09.B01. Las optimizaciones estructurales se determinaron al nivel de teoría B3LYP/6-31+G(d) y B97D/6-31+G(d). Los puntos estacionarios se caracterizaron por el cálculo de las frecuencias, con los autovalores de la matriz Hessiana positivos. El efecto del solvente se evaluó empleando el modelo de *self-consistent reaction field* (SCRF) según el formalismo de Tomasi. Los espectros UV-Visible de los compuestos se estimaron realizando cálculos puntuales al nivel PCM [TD-B3LYP/6-31+G(d)//B97D/6-31+G(d)].

3.4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1- Familia de las Azinas

3.4.1.1- Evaluación de la agregación en *N,N*-dimetilformamida, dimetilfulfóxido y polietilenglicol 400

Se desarrolló un estudio profundo de la agregación de los compuestos pertenecientes a la Familia de las Azinas, para lo cual se emplearon diversos solventes que favorecen la presencia del monómero en solución, con el objetivo de asignar la banda de absorción correspondiente a la especie monomérica de NR y NRBr. Se seleccionaron como solventes DMF,²⁹⁻³¹ DMSO^{32,33} y PEG 400.³⁴⁻³⁶

La evaluación de la agregación en función de la concentración de ambos FS empleando DMF como solvente, indicó que las curvas espectrales obtenidas para las menores concentraciones ensayadas de NR (**Figura 3.2.A**) y NRBr (**Figura 3.2.B**), evidenció una única banda de absorción, cuya λ_{\max} se encuentra a 450 nm para ambos compuestos. Debido a que DMF es un solvente monomerizante y se ensayaron bajas concentraciones de FS, esta banda de absorción se atribuyó a la especie monomérica de los compuestos en estudio.

El incremento de la concentración de los analitos, aumentó la absorción de la banda asignada al monómero y condujo a la aparición de una nueva curva espectral, la cual se atribuyó a la formación de un agregado. Esta banda corresponde al denominado agregado J, debido a que se presenta a mayores longitudes de onda con respecto a la curva espectral del monómero, lo cual puede apreciarse claramente en las curvas espectrales normalizadas (**Figura 3.2.A, inserto** y **Figura 3.2.B, inserto**). La mayor concentración estudiada de NRBr (271,2 μM), presentó un hombro débil a ~ 546 nm asignado a la forma agregada; sin embargo, el máximo de la curva espectral corresponde a la especie monomérica. Las curvas espectrales normalizadas del derivado bromado en DMF (**Figura 3.2.B, inserto**) evidenciaron que la banda monomérica es superponible a las diferentes concentraciones estudiadas.

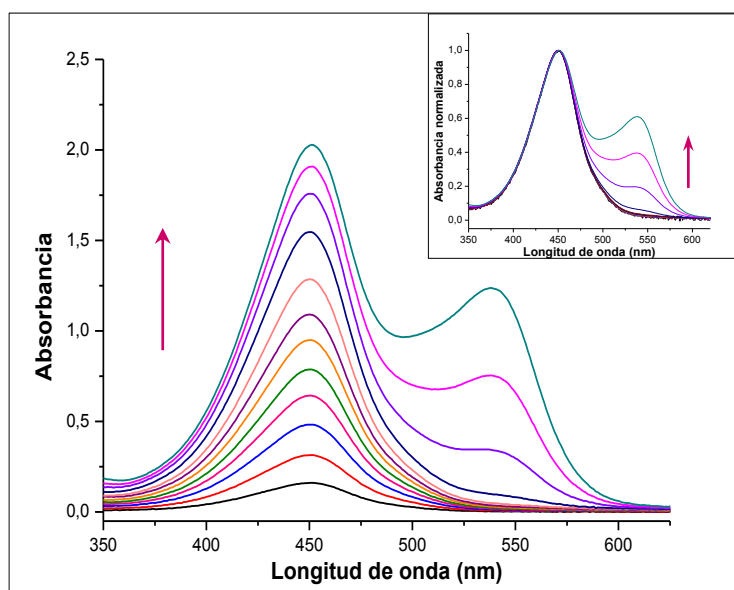


Figura 3.2.A: Espectros de absorción de NR en función de la concentración ($6,9 \mu\text{M}$ - $110,8 \mu\text{M}$) en DMF. **Inserto:** Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción.

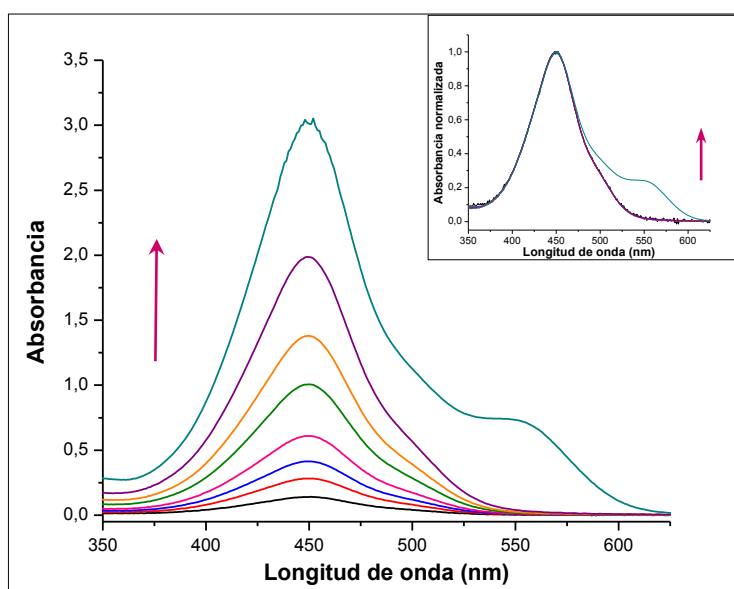


Figura 3.2.B: Espectros de absorción de NRBr en función de la concentración ($10,8 \mu\text{M}$ - $271,2 \mu\text{M}$) en DMF. **Inserto:** Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción.

La banda correspondiente al agregado para ambos compuestos, produjo una importante desviación de la Ley de Lambert-Beer, siendo más significativa para el compuesto NR. La banda atribuible al agregado se evidenció a concentraciones superiores a 69,3 μM para el reactivo de partida, en tanto que para el derivado monobromado se observó a partir de 271,2 μM , por lo tanto en idénticas condiciones, este último compuesto se agregó a concentraciones superiores.

El mismo análisis para ambos compuestos empleando DMSO como solvente, indicó que tanto NR (**Figura 3.3.A**) como NRBr (**Figura 3.3.B**) mostraron la misma tendencia que en DMF. La evaluación de las menores concentraciones empleadas permitió observar la banda del monómero, cuyo máximo se determinó a 456 nm y 454 nm para NR y NRBr, respectivamente. El aumento de la concentración de FS en solución, indicó la aparición de una nueva banda de absorción asignada al agregado tipo J, que se evidenció a 543 nm para NR y 540 nm para el nuevo compuesto.

Al igual que en DMF, el derivado monobromado formó agregados a mayores concentraciones que NR, observando en la curva espectral, la aparición de la nueva banda a concentraciones superiores a 65 y 14 μM respectivamente.

Al comparar los espectros de absorción de ambos FS en DMF y DMSO, se evidenció claramente que el agregado correspondiente al nuevo derivado se detectó a mayores concentraciones, en comparación con el precursor NR. Sobre la base de esta observación, se sugiere que la sustitución con átomos de bromo, favorece la presencia del monómero en solución, conduciendo a un cambio favorable en las propiedades fotofísicas y fotoquímicas del compuesto y por lo tanto de sus características como FS.^{5,37-39}

También se realizó el estudio de agregación de NR y NRBr en una mezcla agua: PEG 400, considerando que éste solvente ha sido aprobado por la FDA como cosolvente para formulaciones parenterales y favorece la monomerización de los compuestos.^{34,35} En relación a esto, se estudió el comportamiento de NR en una mezcla agua: PEG 400 (75:25 v/v) (**Figura 3.4.A**). En estos espectros se evidenció una banda de absorción a 542 nm, asignada a la forma agregada del FS, la cual predominó en todo el intervalo de concentraciones ensayado (3,5 μM – 48,5 μM).

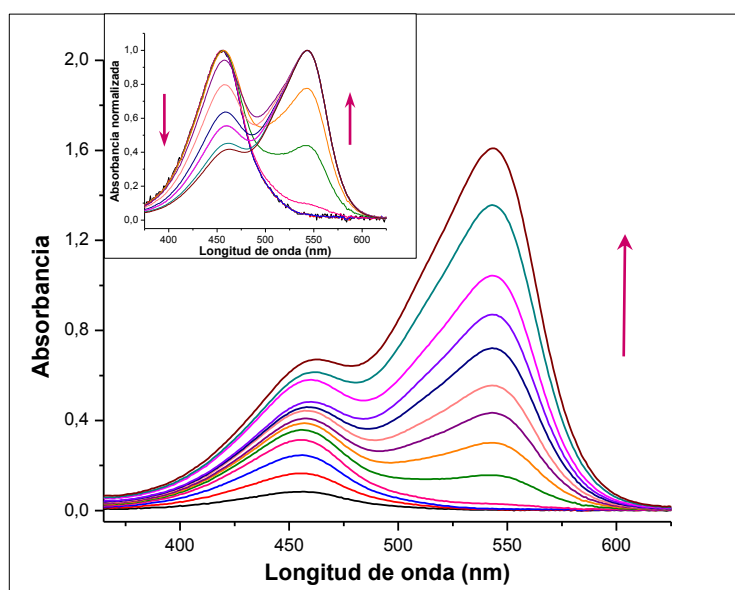


Figura 3.3.A: Espectros de absorción de NR en función de la concentración ($3,5 \mu\text{M}$ - $55,4 \mu\text{M}$) en DMSO. **Inserto:** Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción.

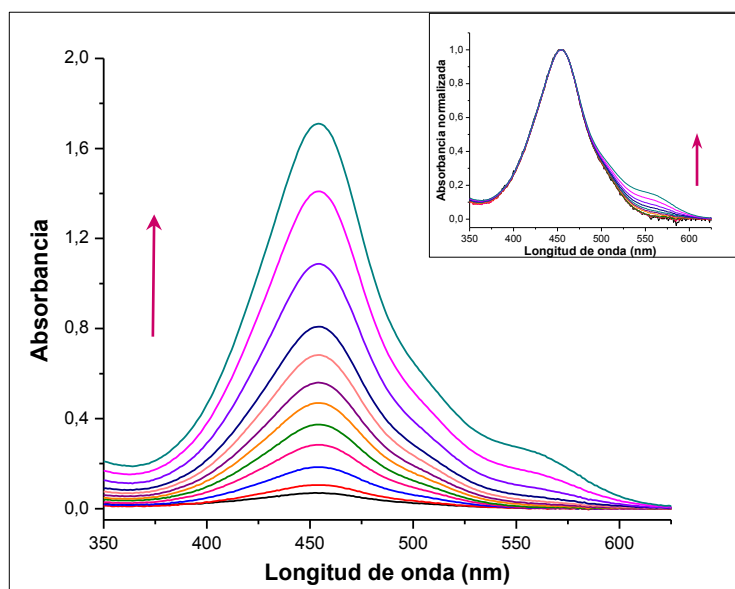


Figura 3.3.B: Espectros de absorción de NRBr en función de la concentración ($2,7 \mu\text{M}$ - $271,2 \mu\text{M}$) en DMSO. **Inserto:** Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción.

Es importante destacar que el hombro a ~ 475 nm, presente en todas las curvas espectrales, corresponde a la especie monomérica de NR. Además, al analizar los espectros de absorción normalizados a 542 nm (**Figura 3.4.A, inserto**) se evidenció la superposición espectral, obedeciendo la Ley de Lambert-Beer.

Un análisis similar se desarrolló para NRBr en el mismo medio (**Figura 3.4.B**), observando el predominio de la especie monomérica a 462 nm. Además, se evidenció un hombro muy débil a ~ 530 nm, correspondiente a la forma agregada del FS. Una observación interesante en el intervalo de concentraciones estudiado ($5,4 \mu\text{M} - 81,4 \mu\text{M}$), es que los espectros de absorción normalizados a 462 nm se presentaron prácticamente superponibles (**Figura 3.4.B, inserto**), indicando la misma tendencia que el compuesto NR.

Es importante destacar que se evidenciaron grandes diferencias en el comportamiento de agregación de ambos FS en todos los medios ensayados. Esto se sustenta, en que el átomo de bromo es un sustituyente voluminoso y por lo tanto, el impedimento estérico generado podría inhibir la agregación entre las unidades moleculares de NRBr, conduciendo a un predominio de la especie monomérica.

Se ha reportado que la agregación de ciertos FS en medios orgánicos, se puede suprimir mediante la incorporación periférica de sustituyentes voluminosos o largas cadenas alquílicas.³⁹⁻⁴¹ Además, diversos autores han confirmado que los sustituyentes lipofílicos voluminosos aseguran una buena monomerización, reportando que la agregación es inhibida de modo más eficiente por el grupo *tert*-butilo que por largas cadenas alquílicas.⁴¹⁻⁴³

3.4.1.2- Evaluación de la agregación en etanol, solución acuosa y mezclas hidroalcohólicas

El etanol es un cosolvente empleado para la forma de dosificación parenteral y se ha reportado que disminuye la formación de agregados en solución.^{5,8,34} Por tal motivo, se realizó una evaluación de ambos compuestos en este solvente y en diversas mezclas hidroalcohólicas (**Figura 3.5 y Figura 3.6**).

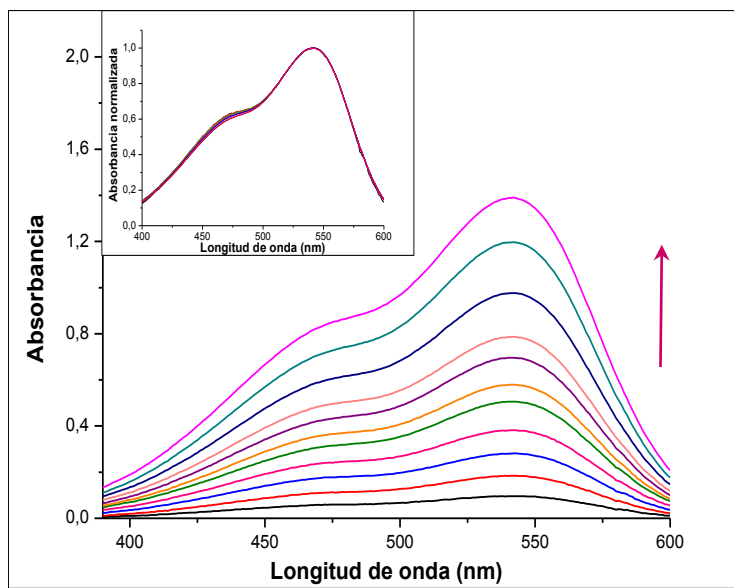


Figura 3.4.A: Espectros de absorción de NR en función de la concentración (3,5 μM - 48,5 μM) en mezcla agua: PEG 400 75:25 v/v. **Inserto:** Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción.

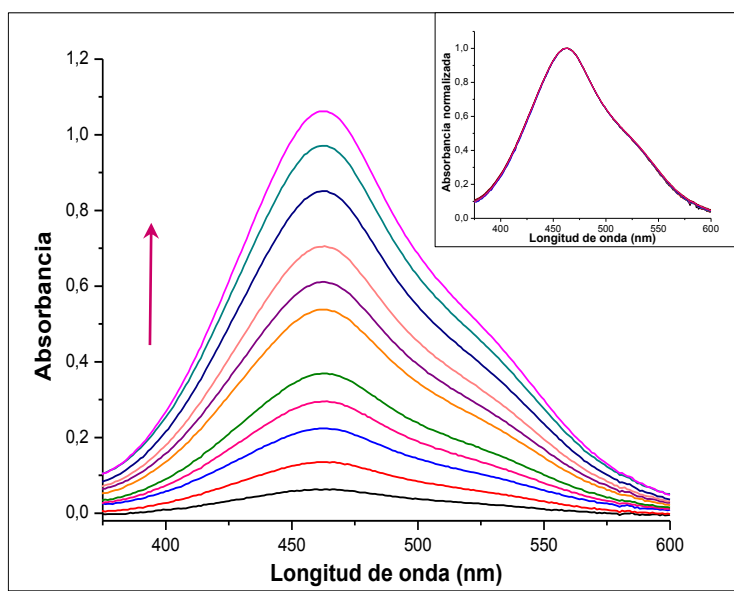


Figura 3.4.B: Espectros de absorción de NRBr en función de la concentración (5,4 μM - 81,4 μM) en mezcla agua: PEG 400 75:25 v/v. **Inserto:** Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción.

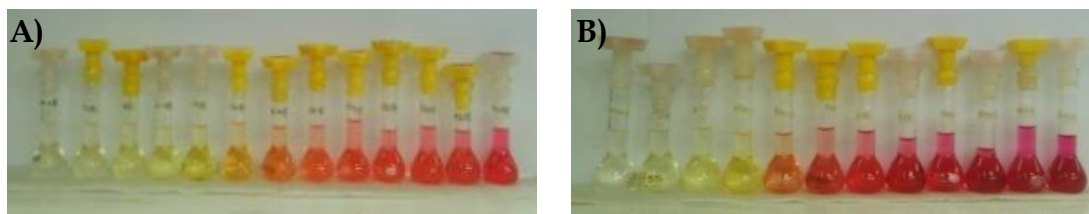


Figura 3.5: Soluciones etanólicas de ambos FS en función de la concentración. **A)** NR; **B)** NRBr.

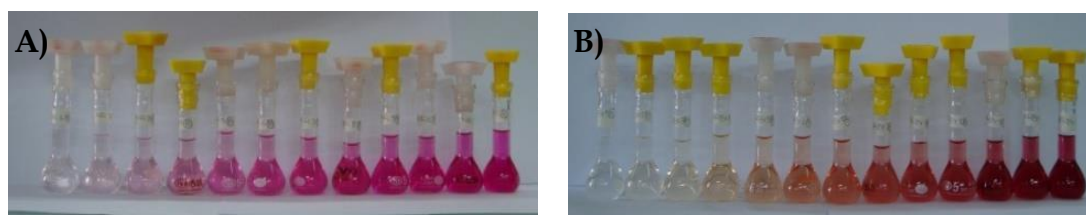


Figura 3.6: Soluciones etanólicas de ambos FS en función de la concentración. **A)** NR; **B)** NRBr.

En la **Figura 3.7.A** se muestran los espectros de absorción en etanol puro correspondientes a NR en función de la concentración. El análisis de los resultados, sugiere que a bajas concentraciones de FS ($< 10,4 \mu\text{M}$), se observó una única banda de absorción a 464 nm asignada a la especie monomérica. El incremento de la concentración de NR ($\geq 13,9 \mu\text{M}$) condujo a un aumento de la intensidad de la banda correspondiente a la especie monomérica, como así también, a la formación de una segunda banda de absorción a 537 nm asignada a la especie agregada (**Figura 3.7.A, inserto**). Siendo que la nueva banda se presenta a mayores longitudes de onda en comparación con el monómero, la misma se atribuyó a agregados J, sugiriendo interacciones tipo cabeza-cola.^{19,44} Estos resultados son claramente comparables con los obtenidos en DMF (**Figura 3.2.A**), sin embargo, la especie agregada de NR se evidenció en este solvente a

mayores concentraciones (69,3 μM) que en etanol (13,9 μM), lo cual se sustenta en el conocimiento de que DMF es un solvente monomerizante.²⁹⁻³¹

Un análisis similar se desarrolló en etanol, para el nuevo agente FS bromado (**Figura 3.7.B**). En este medio, el compuesto presentó a bajas concentraciones un máximo de absorción a 455 nm, asignado a la especie monomérica, en tanto que el aumento de la concentración de NRBr, generó la aparición de una segunda banda a 545 nm. Ésta, fue el máximo de la curva espectral a concentraciones superiores a 32,5 μM , determinando la presencia del compuesto sólo en su forma monomérica a concentraciones inferiores a 16,3 μM .

En la **Figura 3.7.B**, las curvas espectrales a las menores concentraciones de FS ensayadas, se atribuyeron al monómero del compuesto (soluciones de color amarillo) y el aumento de la concentración de NRBr originó una mezcla de monómero y agregado (soluciones de color naranja). El incremento de la concentración por encima de 40,7 μM condujo a un predominio del agregado sobre el monómero (soluciones de color rojo). La Ley de Lambert-Beer no presentó un comportamiento lineal en el intervalo de concentraciones estudiado (2,7 μM - 94,9 μM) y la aparición de la segunda banda espectral fue racionalizada en términos de agregación del FS. La dependencia de la concentración de NRBr en etanol dio lugar a una banda batocrómica correspondiente a un agregado tipo J.

La comparación de los espectros de absorción de NRBr en etanol (**Figura 3.7.B**) con los obtenidos en DMF (**Figura 3.2.B**), destacó la misma tendencia que presentó el compuesto NR. La banda atribuible al agregado de NRBr se observó a mayores concentraciones en DMF (271,2 μM) que en etanol (24,4 μM), lo cual indica que el solvente desempeña un rol fundamental en el comportamiento de la agregación.

La dependencia de la concentración en los espectros de absorción de NRBr en etanol (**Figura 3.7.B**) es cualitativamente similar a la evidenciada por el compuesto NR (**Figura 3.7.A**), ya que ambos FS se caracterizan por presentar un máximo de absorción a ~ 460 nm en soluciones diluidas y cambios espectrales como consecuencia de la agregación.

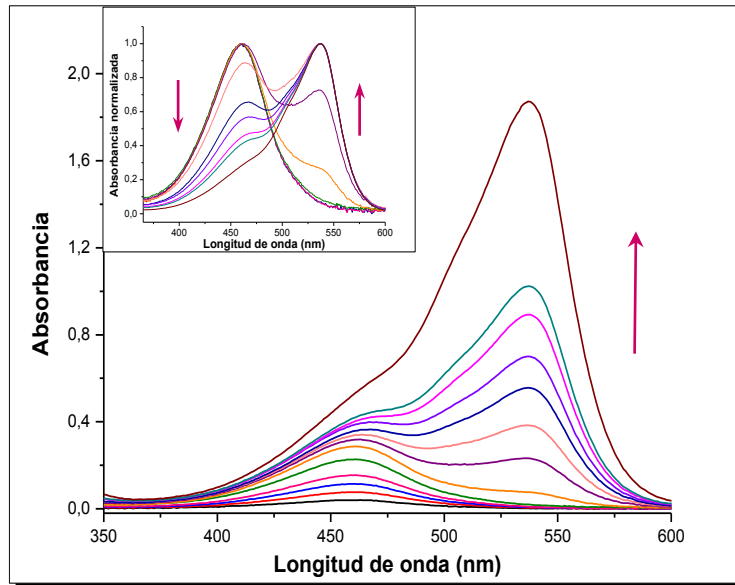


Figura 3.7.A: Espectros de absorción de NR en función de la concentración (1,7 μM - 51,9 μM) empleando etanol como solvente. **Inserto:** Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción.

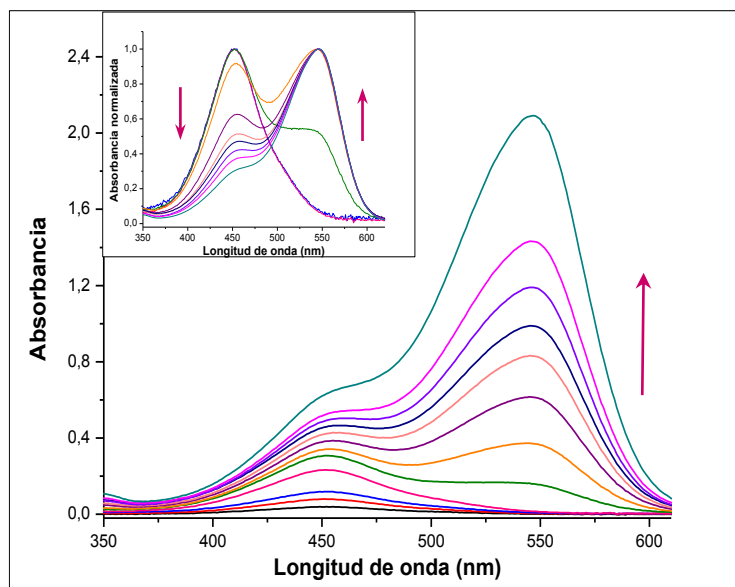


Figura 3.7.B: Espectros de absorción de NRBr en función de la concentración (2,7 μM - 94,9 μM) empleando etanol como solvente. **Inserto:** Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción.

La formación de agregados de NRBr en etanol, se observó a concentraciones de FS ligeramente superiores ($\geq 16,3 \mu\text{M}$) en comparación con NR ($\geq 10,4 \mu\text{M}$), lo que indicó que en este solvente no se evidenciaron diferencias significativas como consecuencia de la incorporación de un átomo de bromo en la estructura molecular. Estas observaciones difieren del análisis de ciertos autores, quienes afirmaron que el FS tetrabromado *Eosin Y* presentó una mayor tendencia a la agregación que su precursor, *Fluorescein*, determinando que la halogenación promueve la agregación de compuestos de la Familia de los Xantenos.⁴⁵

Como se mencionó anteriormente, en etanol no se presentaron diferencias significativas en el comportamiento de agregación de NR y NRBr. Sin embargo, en DMF y en DMSO se evidenció un importante contraste entre los espectros de absorción de ambos FS. Tanto en estos solventes, como en la mezcla agua: PEG 400 (75:25 v/v), el derivado monobromado presentó menor agregación, siendo ésta una propiedad beneficiosa para la TFD y la IFD.^{5,20,27,39,46}

También se analizaron las curvas espectrales de NR en solución acuosa considerando el cambio de la λ_{max} en función de la concentración de FS (**Figura 3.8.A**). Los espectros de absorción normalizados (**Figura 3.8.A, inserto**) evidenciaron un importante corrimiento de 13 nm del máximo de absorción hacia la región azul del espectro electromagnético (desplazamiento hipsocrómico), en función de la concentración de compuesto (0,7 μM – 69,3 μM).

Basándose en la Teoría del Excitón, un modelo monómero-dímero no es satisfactorio para explicar este desplazamiento del máximo de la curva espectral, siendo necesario invocar la formación de agregados superiores, atribuibles a la banda hipsocrómica observada experimentalmente en solución acuosa.^{19,44} Adicionalmente, la presencia de agregados superiores de NR se confirmó por la evidencia de un punto isobéptico a $\sim 575 \text{ nm}$. Resultados similares se han reportado para *Thionine*, un compuesto perteneciente a la Familia de las Tiazinas.¹⁶ Es importante destacar, que las modificaciones espectrales producidas por la agregación de un compuesto, dependen de las propiedades de la molécula aislada, por lo tanto, la magnitud de los cambios espectrales no es indicativo de modo directo del grado de agregación.⁴⁷

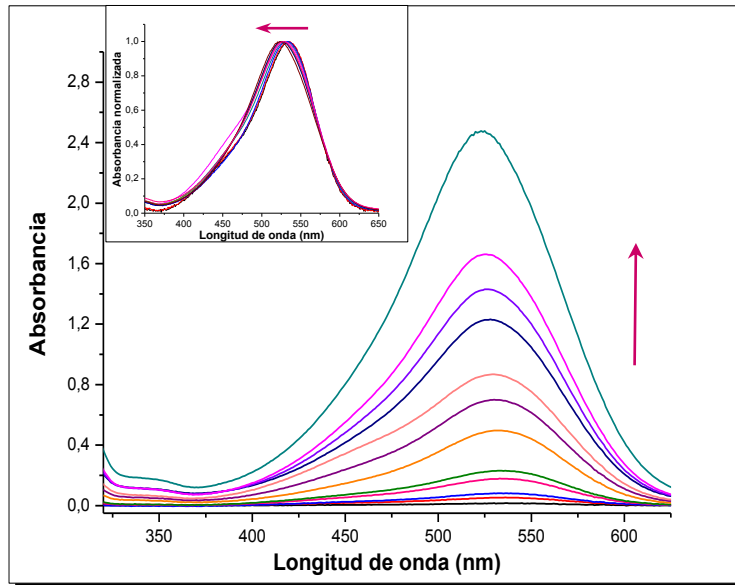


Figura 3.8.A: Espectros de absorción de NR en función de la concentración ($0,7 \mu\text{M}$ - $69,3 \mu\text{M}$) en solución acuosa. **Inserto:** Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción.

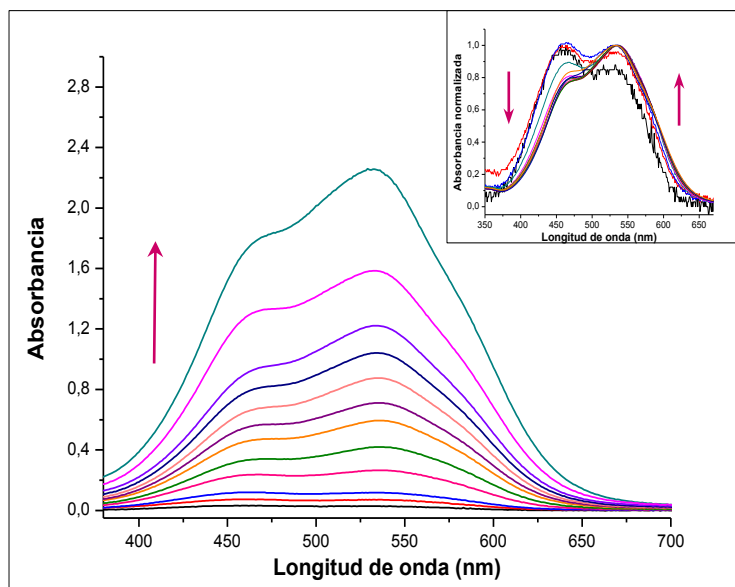


Figura 3.8.B: Espectros de absorción de NRBr en función de la concentración ($2,7 \mu\text{M}$ - $135,6 \mu\text{M}$) en solución acuosa. **Inserto:** Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción.

Las curvas espectrales determinadas para NRBr en función de la concentración en solución acuosa se presentan en la **Figura 3.8.B**. El FS exhibió, aún a la menor concentración ensayada (2,7 μM), una $\lambda_{\text{max}} = 535 \text{ nm}$ con un hombro débil a 468 nm, indicando cambios espectrales menos pronunciados que en etanol (**Figura 3.7.B**). La banda de absorción a 535 nm se asignó a la forma agregada del FS, en tanto que el hombro se atribuyó a la especie monomérica, ya que el incremento de la concentración de NRBr, indicó un predominio del agregado sobre la forma monomérica (**Figura 3.8.B, inserto**).

Estudios similares se desarrollaron con NR en diferentes mezclas agua: etanol (95:5 v/v y 90:10 v/v), demostrando que este solvente orgánico disminuyó la formación de agregados, en concordancia con lo reportado en bibliografía,^{12,24} debido a que el máximo de absorción presentó un corrimiento hipsocrómico de 10 nm y 3 nm, respectivamente. Éstos resultados se atribuyeron a las interacciones específicas entre el soluto y las moléculas de solvente, ya que la agregación de los compuestos en solución es fuertemente dependiente de la naturaleza del solvente.¹⁴

También se evaluó NR en una mezcla agua: etanol (75:25 v/v) (**Figura 3.9.A**), medio en el cual la λ_{max} de la curva espectral no evidenció un corrimiento hipsocrómico, destacándose un hombro débil a $\sim 460 \text{ nm}$, correspondiente a la especie monomérica del FS, el cual se puede observar claramente en las curvas espectrales normalizadas (**Figura 3.9.A, inserto**).

Los resultados obtenidos para el nuevo FS bromado evaluado en agua: etanol (75:25 v/v) se presentan en la **Figura 3.9.B**. Los espectros de absorción de las soluciones concentradas de NRBr revelaron dos bandas de absorción con máximos a 458 nm y 540 nm. Sobre la base de los datos obtenidos (**Figura 3.9.B, inserto**), la forma monomérica del FS se corresponde con la banda de absorción a 458 nm, en tanto que la banda a 540 nm se atribuyó al agregado de NRBr y no se ajustó a la Ley de Lambert-Beer. Al igual que para el compuesto NR, los resultados obtenidos para el nuevo derivado confirmaron que el solvente orgánico favorece la disrupción de los agregados.^{8,24}

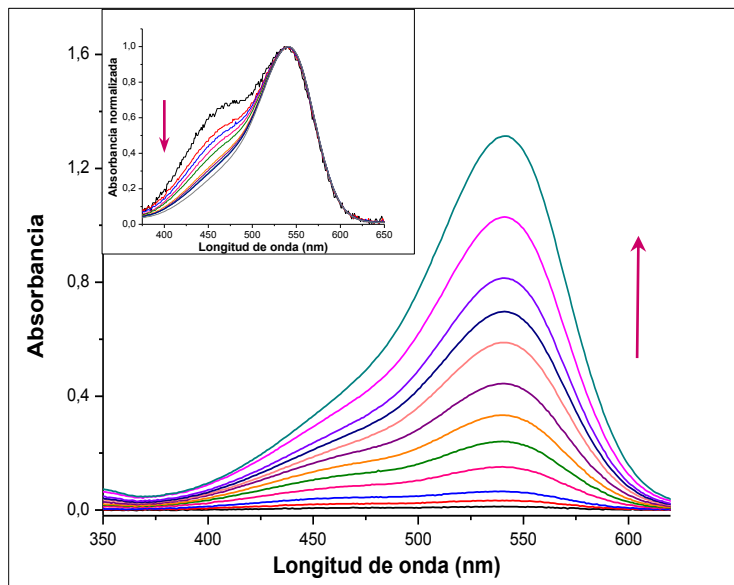


Figura 3.9.A: Espectros de absorción de NR en función de la concentración (0,7 μM - 41,6 μM) en agua: etanol 75:25 v/v. **Inserto:** Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción.

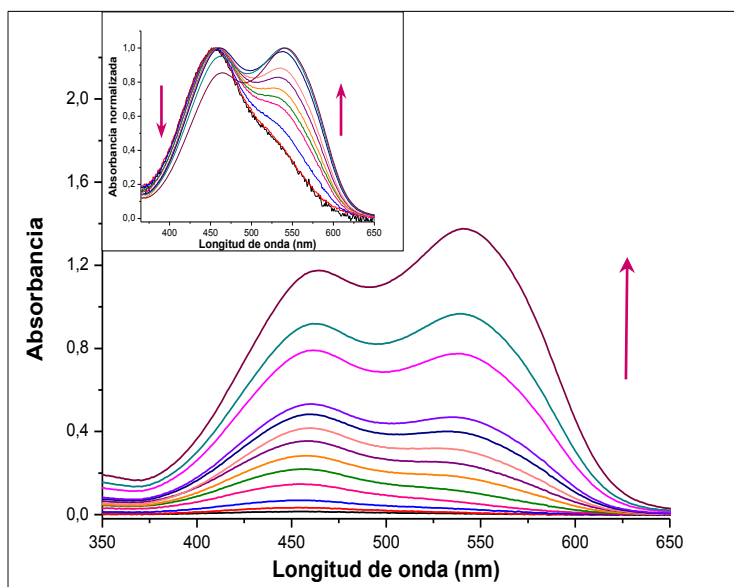


Figura 3.9.B: Espectros de absorción de NRBr en función de la concentración (1,1 μM - 97,6 μM) en agua: etanol 75:25 v/v. **Inserto:** Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción.

Al realizar la comparación de los efectos de la misma proporción de PEG 400 y etanol en mezclas acuosas (**Figura 3.4.B** y **Figura 3.9.B**) se evidenció que el PEG 400 favoreció significativamente la presencia de la especie monomérica de NRBr, en concordancia con antecedentes bibliográficos.^{35,36}

Además, se desarrollaron estudios de ambos compuestos en diversas mezclas hidroalcohólicas, manteniendo constante las concentraciones de FS en 6,9 μM y 27,1 μM para NR y NRBr respectivamente, ya que a dichas concentraciones los agregados no eran detectables en etanol puro.

Los espectros de absorción de NR en diferentes mezclas agua: etanol, se muestran en la **Figura 3.10.A**. Las curvas en agua: etanol 75:25 v/v (*curva d*) y 50:50 v/v (*curva e*), son significativamente diferentes de las determinadas en agua: etanol 25:75 v/v (*curva f*) y etanol puro (*curva g*), siendo los espectros de absorción claramente dependientes del medio. La adición de cantidades crecientes de etanol a agua pura, disminuyó gradualmente la banda de absorción a 537 nm, correspondiente a la forma agregada, conduciendo a un incremento de la banda a 464 nm, asignada a la especie monomérica. Estos ensayos indicaron que el agregado de NR prácticamente no es detectable en etanol puro o en agua: etanol 25:75 v/v, lo que puede explicarse considerando que la fuerza de agregación entre dos o más moléculas depende, entre otros factores, de la presencia de solvente del medio, siendo en general predominante la agregación en agua que en solventes orgánicos.^{8,28,48}

Como se desprende de la **Figura 3.10.B**, los espectros de absorción de NRBr en agua pura (*curva a*) y en la mezcla agua: etanol 95: 5 v/v (*curva b*), exhibieron una banda de absorción a ~ 535 nm asignada a la especie agregada y un hombro a 468 nm, correspondiente a la forma monomérica. Con el incremento del porcentaje de etanol en el medio, se observó únicamente la banda atribuible al monómero a ~ 458 nm, por lo que estos resultados sugieren que el aumento de etanol condujo a la disminución de la absorción a 535 nm y al incremento de la banda correspondiente a la especie monomérica.

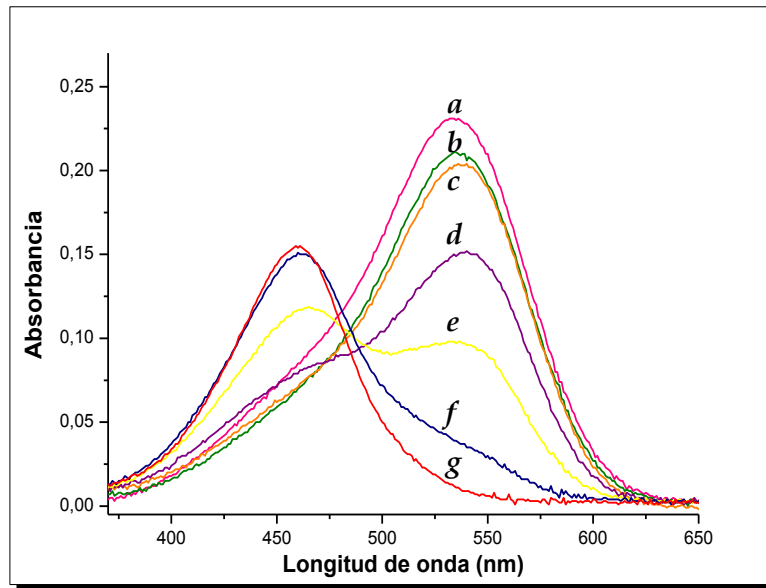


Figura 3.10.A: Espectros UV-Visible de NR a 6,9 μM en solución acuosa. Distintas proporciones agua: etanol a) 100: 0; b) 95: 5; c) 90:10; d) 75:25; e) 50:50; f) 25:75; g) 0: 100.

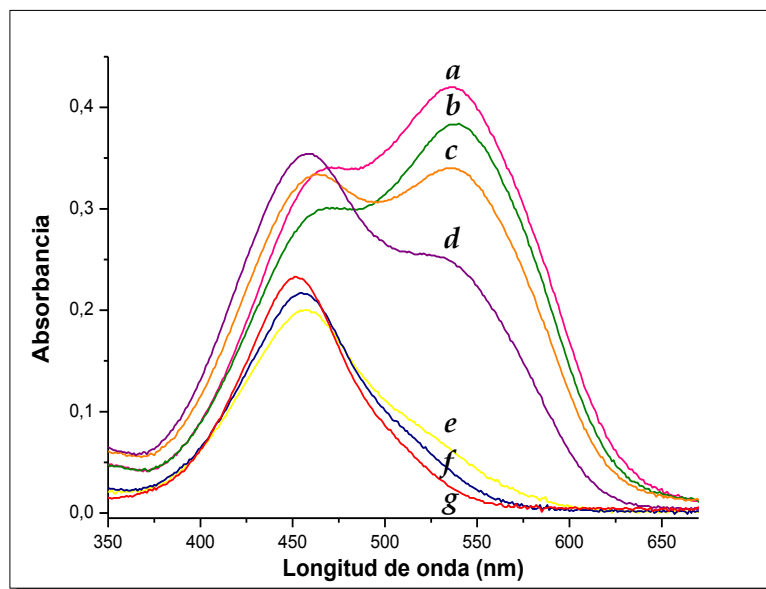


Figura 3.10.B: Espectros UV-Visible de NRBr a 27,1 μM en solución acuosa. Distintas proporciones agua: etanol a) 100: 0; b) 95: 5; c) 90:10; d) 75:25; e) 50:50; f) 25:75; g) 0: 100.

Los resultados obtenidos revelaron que prácticamente no se observó especie agregada en las mezclas agua: etanol 50:50 v/v (*curva e*), 25:75 v/v (*curva f*) y etanol puro (*curva g*).

Una comparación interesante surge de los espectros de absorción de los dos FS en agua: etanol 50:50 v/v (**Figura 3.10.A**, *curva e* y **Figura 3.10.B**, *curva e*), en la cual se evidenció para el compuesto NR, la forma agregada a 537 nm, en tanto que para el derivado NRBr sólo se observó la forma monomérica a 458 nm.

Se puede concluir que la presencia de un sustituyente voluminoso en NR, favoreció la monomerización debido a un efecto estérico, conduciendo a mejores características fotofísicas y fotoquímicas para el nuevo derivado, impactando en sus propiedades como FS.^{49,50} Sin embargo, estas observaciones contradicen lo informado por ciertos autores que sostienen que el incremento de la lipofilicidad de los compuestos, conduce a un aumento en la tendencia a la agregación.^{20,51}

Los átomos de halógenos pueden modificar las propiedades electrónicas de los FS debido a los efectos de resonancia, siendo esto ampliamente estudiado en compuestos pertenecientes a la Familia de las Ftalocianinas, con átomos electronegativos de flúor y cloro. Las diferencias observadas, podrían ser el resultado de cambios en la distribución de electrones π , debido a efectos mesoméricos y/o inductivos. Además, la estructura molecular de los FS y su entorno pueden influenciar fuertemente el efecto de carga puntual, afectando por consiguiente, las propiedades fotofísicas.⁵²

Se han propuesto diversos mecanismos para explicar las fuerzas que mantienen unidas las moléculas iónicas en solución.⁸ La interacción molécula-molécula en el agregado más simple, el dímero, debe ser lo suficientemente fuerte como para superar cualquier otra fuerza que favorecería la solvatación del monómero.⁵³ La agregación en menor extensión del nuevo derivado NRBr, constituye un resultado muy prometedor, debido a que la agregación disminuye los tiempos de vida de los estados excitados, reduciendo el rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete.⁴² Desde un punto de vista biológico, se espera que el nuevo derivado predomine como monómero en las membranas celulares, en

comparación con el reactivo de partida, por lo que este compuesto podría ser un óptimo FS para aplicaciones en la TFD y la IFD.

3.4.1.3- Evaluación de la agregación en soluciones *buffer*

Con la finalidad de analizar el efecto de las condiciones de pH fisiológico, (pH=1,2; 5,8 y 7,4) en el comportamiento de la agregación de NR y NRBr, se estudiaron y compararon los correspondientes espectros de absorción.

Por consiguiente, la forma protonada de NR en solución *buffer* de pH=1,2 en función de la concentración de FS (1,4 μM - 97,0 μM) evidenció un desplazamiento de la λ_{max} hacia el azul del espectro electromagnético, de 532 nm a 523 nm (**Figura 3.11**). Además, se observó un punto isobéptico a ~ 587 nm y la desviación de la Ley de Lambert-Beer en el intervalo de concentraciones evaluado.

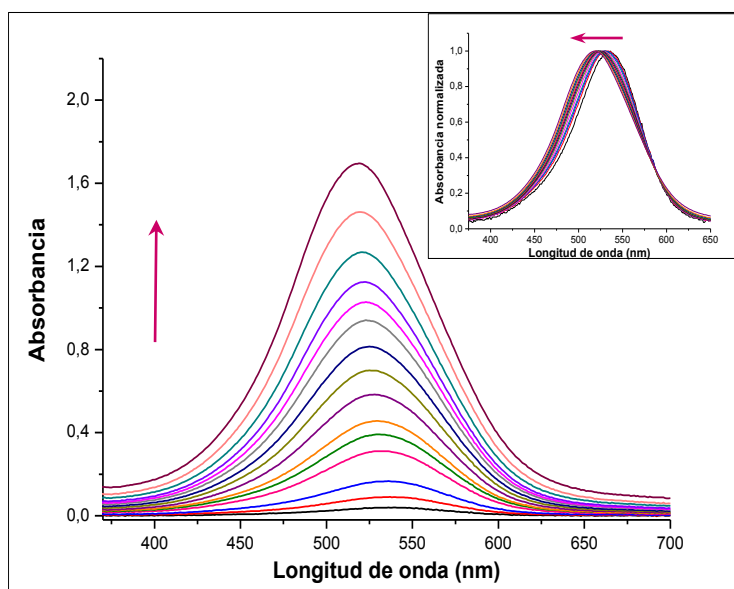


Figura 3.11: Espectros de absorción de NR en función de la concentración (1,4 μM - 97,0 μM) en *buffer* de pH=1,2. **Inserto:** Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción.

La banda observada a ~ 532 nm se asignó a la forma agregada de NR, en tanto que el desplazamiento hacia el azul en función del incremento de la concentración de agente FS, se atribuyó a agregados de orden superior (**Figura 3.11, inserto**). La especie monomérica no se evidenció en este medio y un desplazamiento similar hacia el azul del espectro electromagnético se observó en solución *buffer* de pH=5,8.

También se evaluó el nuevo derivado NRBr en *buffer* de pH=1,2 en función de la concentración (1,1 μM - 94,9 μM) (curvas espectrales no mostradas). Los espectros de absorción de este compuesto presentaron, a la menor concentración estudiada, un máximo a 541 nm, mientras que la concentración más alta evidenció el máximo de la curva espectral a 529 nm, por lo que el incremento de la concentración de analito condujo a un desplazamiento hacia el azul de 12 nm y un punto isobéstico a ~ 600 nm. Este cambio del máximo de absorción del FS se puede explicar en los mismos términos que para el compuesto NR.

Los espectros de absorción de NRBr a pH=5,8 registrados a diferentes concentraciones se presentan en la **Figura 3.12**. A las menores concentraciones ensayadas ($\leq 138,8 \mu\text{M}$), el FS exhibió una λ_{max} a 537 nm y un hombro a ~ 468 nm. A mayores concentraciones, la banda a 468 nm se evidenció como el máximo de la curva espectral. La banda a 537 nm se atribuyó a la forma agregada de NRBr, en tanto que el nuevo máximo espectral a 468 nm se asignó a agregados de orden superior. Estos cambios espectrales se acompañaron por la presencia de un punto isobéstico a ~ 580 nm, lo que sugiere la formación de especies agregadas (**Figura 3.12, inserto**).

Los espectros de absorción de NRBr en solución acuosa (agua Milli-Q®, pH=5,76) han sido discutidos previamente (**Figura 3.8.B**). A las menores concentraciones ensayadas ($\leq 10,8 \mu\text{M}$), se evidenció una banda de absorción a 468 nm, atribuida al monómero del compuesto bromado, en tanto que el hombro a 535 nm asignado a la forma agregada del compuesto, se evidenció como el máximo de la curva espectral al aumentar la concentración de FS.

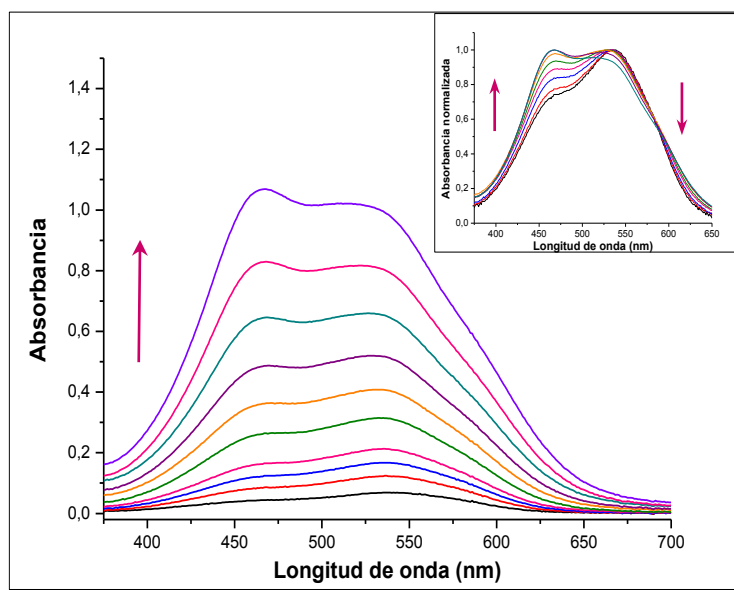


Figura 3.12: Espectros de absorción de NRBr en función de la concentración (10,8 μM - 271,2 μM) en *buffer* pH=5,8. **Inserto:** Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción.

Las diferencias observadas a partir de la comparación de los espectros de NRBr en solución *buffer* pH=5,8 (**Figura 3.12**) y en solución acuosa (**Figura 3.8.B**) podría explicarse debido a la alta fuerza iónica de la solución *buffer* de pH=5,8 (0,5 M) lo cual incrementa en gran medida la tendencia a la agregación; visualizando por lo tanto, agregados de orden superior en la solución *buffer*.^{36,54}

Como se puede evidenciar en la **Figura 3.13**, los espectros de absorción de NR ($\text{pK}_a=7,0 \pm 0,8$) en solución *buffer* de pH=7,4 sugieren la deprotonación de la especie catiónica debido a que las curvas espectrales presentan dos bandas de absorción; un máximo a 528 nm correspondiente a la forma catiónica del compuesto y un hombro a ~ 470 nm asignado a la forma neutra del FS⁵⁵⁻⁵⁷ (**Sección 4.4.1: "Constante de Disociación Ácido-Base"**).

La banda atribuida a la forma catiónica agregada de este compuesto, presentó un punto isobéptico a ~ 572 nm y un desplazamiento de la λ_{max} de 16 nm hacia el azul del espectro electromagnético (de 528 nm a 512 nm), como una función de la concentración de NR.

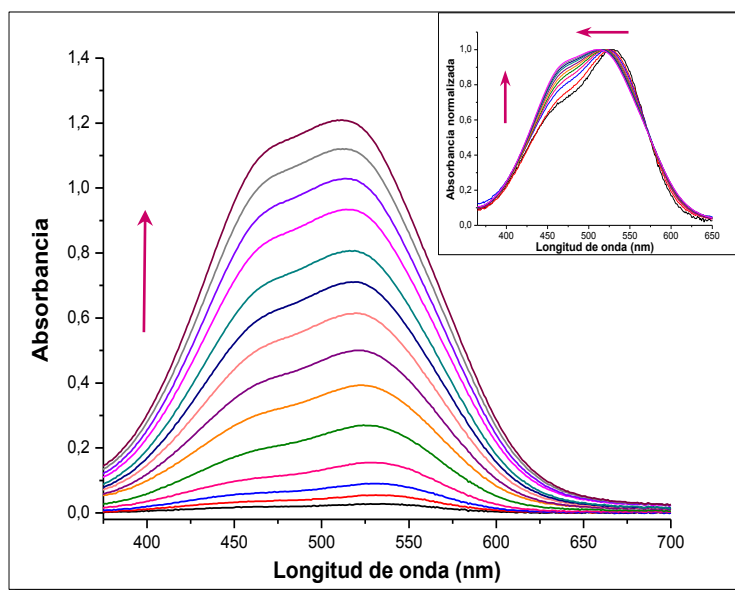


Figura 3.13: Espectros de absorción de NR en función de la concentración ($1,0 \mu\text{M}$ - $76,2 \mu\text{M}$) en *buffer* pH=7,4. **Inserto:** Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción.

Cabe destacar que partir de los espectros de absorción normalizados (**Figura 3.13**, **inserto**) se evidenció un incremento en la absorción de la banda asignada a la especie neutra de NR ($\sim 470 \text{ nm}$) en comparación con la forma catiónica, en función de la concentración de FS. Este cambio espectral se atribuyó a la formación de agregados de orden superior de la especie neutra. Es importante mencionar que no existen antecedentes de la evaluación de este compuesto en *buffer* pH=7,4 en función de la concentración ($1,0 \mu\text{M}$ - $76,2 \mu\text{M}$), asignando las bandas correspondientes a la especie neutra y catiónica.

Por su parte, la forma neutra de NRBr presente en solución *buffer* pH=7,4 es incolora, razón por la cual las curvas espectrales no son discutidas.

3.4.1.4- Desarrollo de cálculos teóricos

Debido a la gran cantidad de resultados contradictorios publicados con relación al fenómeno de agregación, fue necesario corroborar las asignaciones realizadas

empleando cálculos teóricos. La absorción máxima de los compuestos se calculó luego de la optimización inicial de la geometría molecular.

Las longitudes de onda de máxima absorción teóricas (λ_T) se compararon con los datos experimentales obtenidos de los espectros UV-Visible para NR y el nuevo derivado bromado en DMF, DMSO y etanol (**Tabla 3.1**).

Tabla 3.1: Longitud de onda de máxima absorción experimental (λ_E) y teórica (λ_T) de NR y NRBr en diversos solventes.

Compuesto	DMF		DMSO		Etanol	
	λ_E (nm)	λ_T (nm)	λ_E (nm)	λ_T (nm)	λ_E (nm)	λ_T (nm)
NR	450	464,9	456	471,1	462	465,8
NRBr	450	470,1	454	478,5	452	470,8

Los cálculos desarrollados indicaron que las curvas espectrales calculadas y experimentales para ambos compuestos son similares. El máximo de absorción teórico en la región visible del espectro electromagnético es próximo a la banda experimental asignada a la forma monomérica de ambos FS.

Las **Figuras 3.14** evidencian el estado excitado simulado o teórico y la banda de absorción visible experimental de NR (**Figura 3.14.A**) y NRBr (**Figura 3.14.B**) en etanol. Se destaca que la banda monomérica experimental y la obtenida mediante cálculos teóricos son próximas entre sí, y así mismo, difieren de las bandas asignadas a los agregados de ambos FS, corroborando de este modo la asignación del monómero en los diferentes sistemas estudiados.

Diferencias similares entre los espectros de absorción calculados y los determinados de manera experimental, han sido informadas para otros compuestos FS.⁵⁸⁻⁶⁰

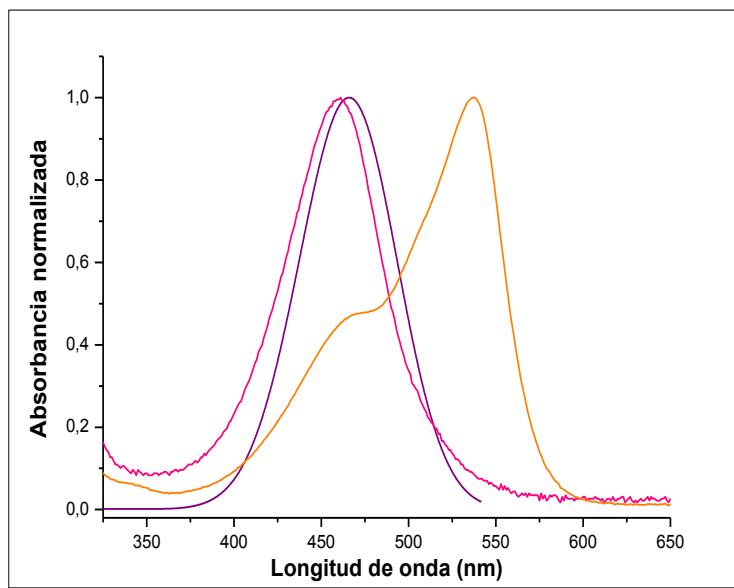


Figura 3.14.A: Banda de absorción visible teórica y experimental de NR en etanol. Espectro teórico del monómero (—); Espectro experimental del monómero (—); Espectro experimental del agregado (—).

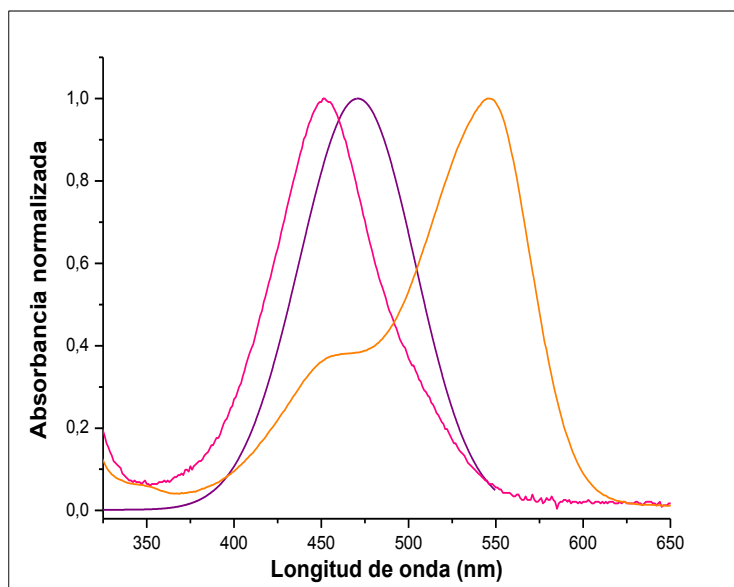


Figura 3.14.B: Banda de absorción visible teórica y experimental de NRBr en etanol. Espectro teórico del monómero (—); Espectro experimental del monómero (—); Espectro experimental del agregado (—).

3.4.2- Familia de las Oxazinas y Oxazonas

3.4.2.1- Evaluación de la agregación en *N,N*-dimetilformamida, etanol, polietilenglicol 400 y solución acuosa

El compuesto CV se estudió en DMF y los espectros de absorción en función de la concentración se observan en la **Figura 3.15**. El FS presentó una banda de absorción a 482 nm, evidenciando un aumento de la intensidad con el incremento de la concentración. Las curvas espectrales normalizadas en este medio (**Figura 3.15, inserto**) revelaron que la banda de absorción es superponible a las diferentes concentraciones ensayadas, por lo tanto, el análisis de estos resultados sugiere que en estas condiciones experimentales está presente una única especie. Considerando que se ensayaron concentraciones bajas del compuesto (3,1 μM - 56,0 μM) y que DMF es un solvente orgánico que favorece la especie monomérica en solución,²⁹⁻³¹ la banda espectral observada se asignó a la forma monomérica del FS.

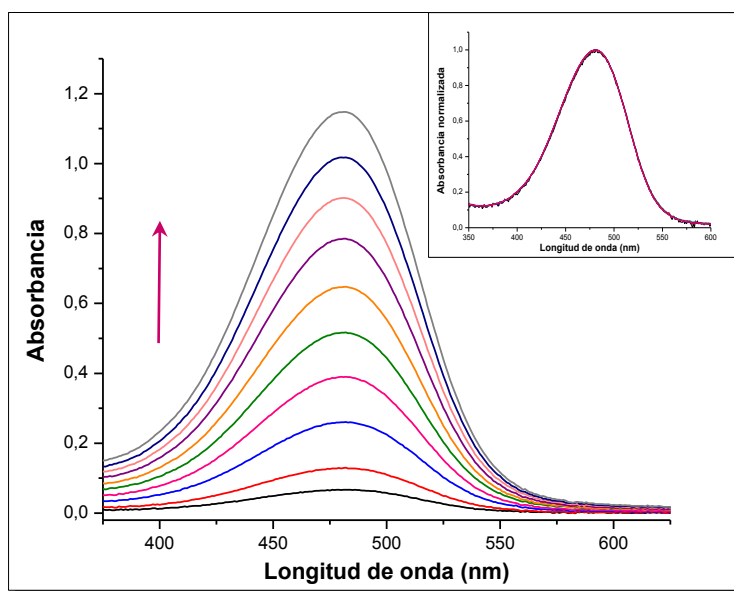


Figura 3.15: Espectros de absorción de CV en función de la concentración (3,1 μM - 56,0 μM) en DMF. **Inserto:** Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción.

Una observación interesante a partir del inserto de la **Figura 3.15**, es que el aumento de la concentración de FS condujo a un incremento de la absorbancia de la especie monomérica sin evidenciar una nueva banda espectral. Además, en el intervalo de concentraciones estudiado, el compuesto se ajustó a la Ley de Lambert-Beer.

Las curvas espectrales de CV en función de la concentración (3,1 μM - 46,7 μM) en etanol se presentan en la **Figura 3.16**. El compuesto exhibió una banda de absorción a 602 nm con un hombro muy débil a ~ 480 nm, estando ambos presentes en la curva espectral aún a la menor concentración estudiada. La banda a 602 nm se asignó a la forma agregada de CV, en tanto que la especie monomérica es la responsable del hombro que se observa a ~ 480 nm.

Es ampliamente conocido que la agregación de los compuestos iónicos es posible, si existen ciertas fuerzas atractivas que superen la repulsión coulombica, atrayendo las moléculas componentes a una distancia razonable para formar dímeros y posteriormente mayores agregados. La geometría y la inclinación de las moléculas en el dímero, como así también la distancia mínima de aproximación, son de fundamental importancia para comprender el rol de las interacciones hidrófobas y el factor estérico en la formación de agregados.⁶

En este caso experimental, se evidenció una banda a 602 nm atribuida a la forma agregada del compuesto, siendo esta especie la predominante en todo el intervalo de concentraciones estudiado. Los espectros de absorción normalizados (**Figura 3.16, inserto**) presentan curvas espectrales prácticamente superponibles, sin embargo, el aumento de la concentración de FS condujo a una disminución de la banda espectral asignada al monómero (~ 480 nm), en comparación con el agregado.

Con la finalidad de confirmar la presencia del monómero en este solvente, se realizaron determinaciones empleando celdas de cuarzo de 5 cm de paso óptico y soluciones de menor concentración (0,6 μM - 3,1 μM). Los resultados obtenidos, evidenciaron una buena definición del hombro espectral (**Figura 3.17**), lo que confirmó la asignación realizada a la especie monomérica (**Figura 3.17, inserto**).

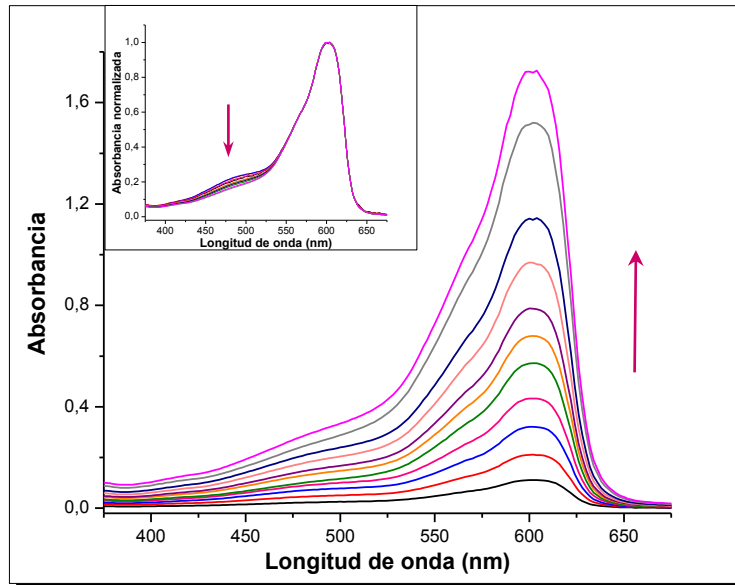


Figura 3.16: Espectros de absorción de CV en función de la concentración ($3,1 \mu\text{M}$ – $46,7 \mu\text{M}$) en etanol. **Inserto:** Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción.

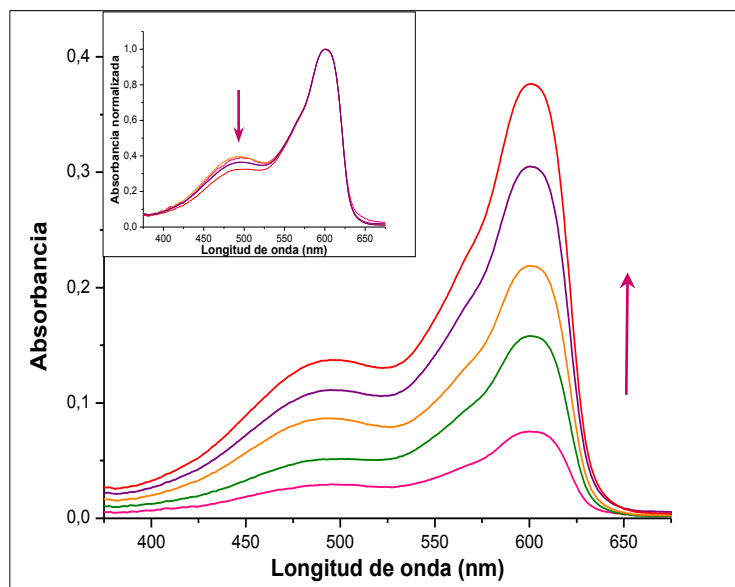


Figura 3.17: Espectros de absorción de CV en función de la concentración ($0,6 \mu\text{M}$ – $3,1 \mu\text{M}$) en etanol. **Inserto:** Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción.

También se analizaron los espectros de absorción del compuesto CV en diferentes mezclas DMF: etanol. Se seleccionó $18,7 \mu\text{M}$ como la concentración constante de FS, ya que la absorbancia del monómero y del agregado se encuentran en el intervalo de menor error espectrofotométrico. Como se desprende de la **Figura 3.18**, las curvas espectrales de CV en los solventes puros y en mezclas DMF: etanol son significativamente diferentes, siendo la absorción de éste agente FS fuertemente dependiente del medio ensayado. La adición de cantidades crecientes de etanol a DMF, condujo a la disminución gradual de la banda de absorción asignada a la especie monomérica, evidenciada a 482 nm en DMF puro (*curva g*) y al incremento de la banda de absorción correspondiente al agregado, presente a 602 nm en etanol puro (*curva a*).

Este estudio reveló que solamente en DMF, el monómero es detectable sin observar agregado, lo cual se encuentra alineado con literatura, ya que DMF es un conocido solvente monomerizante.²⁹⁻³¹

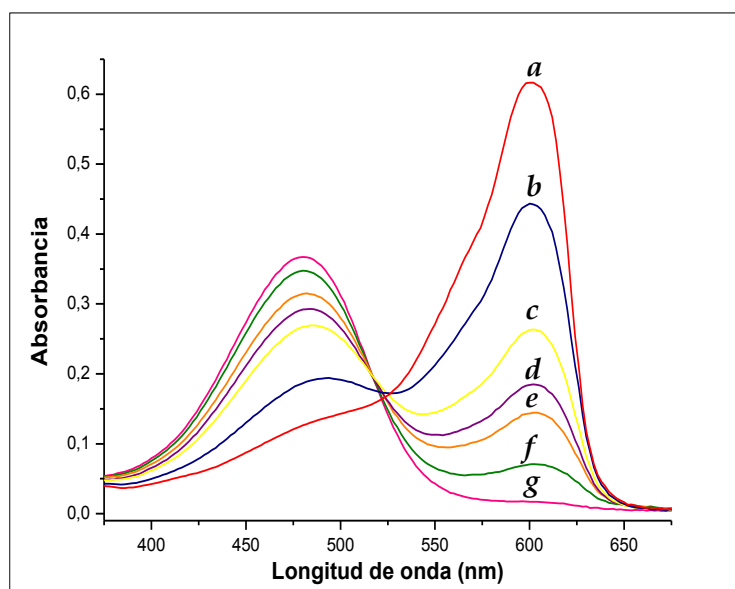


Figura 3.18: Espectros UV-Visible de CV a $18,7 \mu\text{M}$ en DMF. Distintas proporciones DMF: etanol a) 0: 100; b) 25:75; c) 50:50; d) 62,5: 37,5; e) 75:25; f) 87,5:12,5; g) 100:0.

La evaluación de altas proporciones de etanol, evidenciaron la banda del agregado a 602 nm y un hombro muy débil a ~ 480 nm. Por lo tanto, este estudio sugiere que el incremento del porcentaje de etanol en el medio, condujo a la disminución de la absorbancia de la especie monomérica (480 nm) con un incremento en la definición de la banda atribuible al agregado.

También se realizó la evaluación de CV en agua: PEG 400 (75:25 v/v) con la finalidad de estudiar las diferentes especies en solución y corroborar la asignación de las distintas bandas. Considerando que PEG 400 es un buen solvente monomerizante³⁵⁻³⁶ y que en general los compuestos se agregan más fuertemente en agua que en solventes orgánicos,^{8,28,48} se desarrolló el análisis de los resultados obtenidos. El comportamiento de CV en función de la concentración de FS se observa en la **Figura 3.19**, evidenciando que el agregado del compuesto es la única especie en solución y responsable de la banda espectral a 596 nm. La evaluación de los espectros de absorción normalizados (**Figura 3.19, inserto**) señala que todas las curvas espectrales son superponibles, ajustándose a la Ley de Lambert-Beer en el intervalo de concentraciones estudiado (3,1 μM - 43,6 μM).

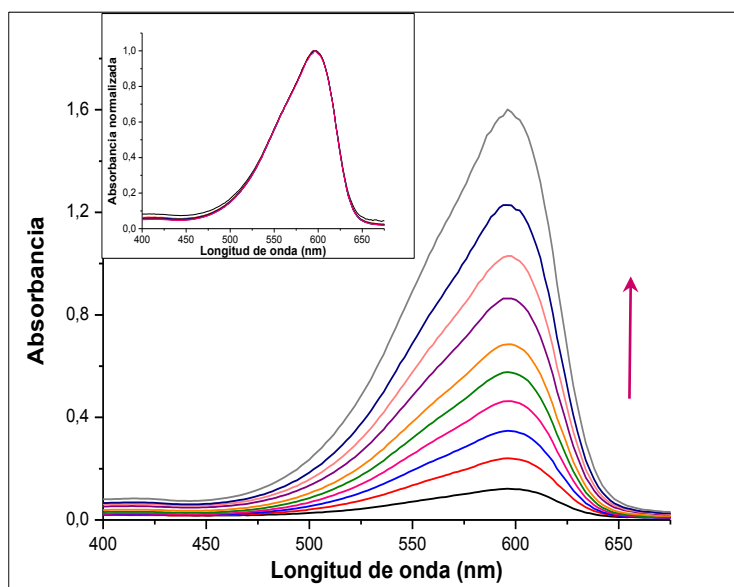


Figura 3.19: Espectros de absorción de CV en función de la concentración (3,1 μM - 43,6 μM) en agua: PEG 400 75:25 v/v. **Inserto:** Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción.

También se realizó la evaluación de CV en solución acuosa con la finalidad de comparar los resultados obtenidos con los datos de literatura.^{48,61-63}

Las curvas espectrales en solución acuosa de este FS en función de la concentración (3,1 μM - 56,0 μM) se presentan en la **Figura 3.20**. El compuesto exhibió una banda de absorción a 586 nm con un hombro a ~ 550 nm, ambos presentes, aún a las menores concentraciones ensayadas. Es importante destacar que el aumento de la concentración de compuesto condujo a un incremento de la intensidad de ambas bandas.

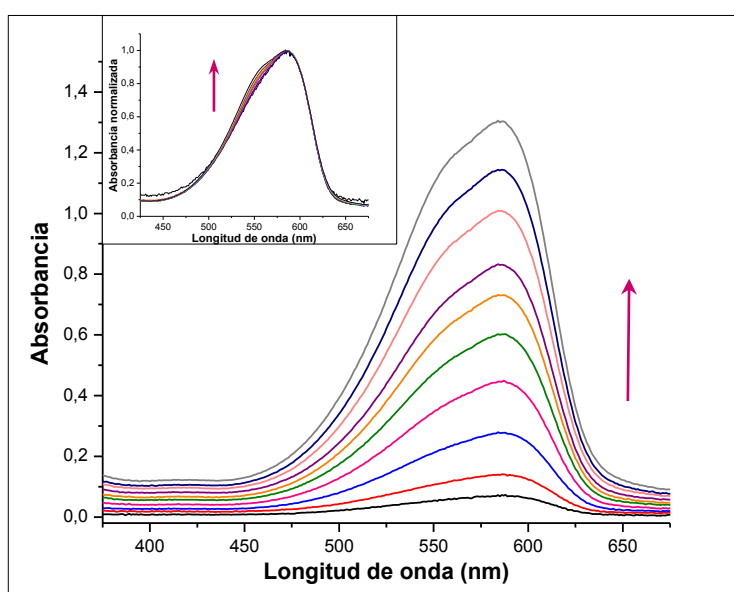


Figura 3.20: Espectros de absorción de CV en función de la concentración (3,1 μM - 56,0 μM) en solución acuosa. **Inserto:** Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción.

El inserto de la **Figura 3.20**, presenta los espectros de absorción normalizados de CV en solución acuosa, evidenciando claramente que el agregado es la especie predominante y responsable de la banda principal a 586 nm. El incremento de la concentración de compuesto produjo un aumento más pronunciado del hombro espectral a 550 nm en comparación con la banda a 586 nm. Surge de este análisis, que la banda principal corresponde a la especie agregada de CV, en tanto que el

hombro a 550 nm es atribuible a mayores agregados. La presencia de diferentes agregados en solución es revelada por un punto isobéptico a ~ 510 nm. Las asignaciones realizadas como consecuencia de este desarrollo experimental, difieren de las propuestas por otros autores que evaluaron al compuesto CV en solución acuosa y a altas concentraciones, asignando a la especie monomérica la banda a 586 nm.^{48,61-63}

También se abordó la evaluación del nuevo compuesto CVBr₃ en DMF, exhibiendo una única banda de absorción a 474 nm en el intervalo de concentraciones de 1,8 μ M a 32,3 μ M, la cual se asignó a la especie monomérica (no se muestran las curvas espectrales). Las curvas normalizadas revelaron que la banda monomérica fue superponible. La comparación de los espectros de absorción de CV, con los obtenidos para el nuevo derivado CVBr₃ en este solvente, indicó que ambos FS presentaron la misma tendencia, con una banda a ~ 480 nm atribuida a la forma monomérica del compuesto.

Además, el derivado CVBr₃ se evaluó en función de la concentración (1,8 μ M – 32,3 μ M) en etanol y las curvas espectrales obtenidas se presentan en la **Figura 3.21**. Las menores concentraciones ensayadas, evidenciaron una banda de absorción a 474 nm asignada a la especie monomérica, sin embargo, el incremento de la concentración del nuevo derivado polibromado, permitió detectar una segunda banda espectral a longitudes de onda superiores. Este FS se presentó como única especie monomérica a concentraciones $< 14,3$ μ M, en tanto que la nueva banda a 594 nm fue el máximo de la curva espectral a concentraciones $> 32,3$ μ M. En las condiciones experimentales ensayadas, no se observó un ajuste a la Ley de Lambert-Beer y la nueva banda espectral es interpretada en términos de agregación del compuesto.^{10,53}

La dependencia de la concentración de CVBr₃ en etanol produjo una banda batocrómica (agregado-J), ya que se encuentra desplazada hacia el rojo del espectro electromagnético con respecto a la forma monomérica.^{19,44}

La formación de agregados de CVBr₃ en etanol se observó a mayores concentraciones ($\geq 17,9$ μ M) en comparación con el reactivo de partida CV ($\geq 3,1$ μ M), evidenciando en este solvente diferencias significativas como consecuencia

de la presencia de tres átomos de bromo en la molécula (**Figura 3.22**). Una de las posibles explicaciones a esta diferencia en la agregación de ambos compuestos, es que siendo los átomos de bromo sustituyentes voluminosos, podrían favorecer la monomerización como consecuencia del impedimento estérico entre las unidades moleculares.³⁹⁻⁴³

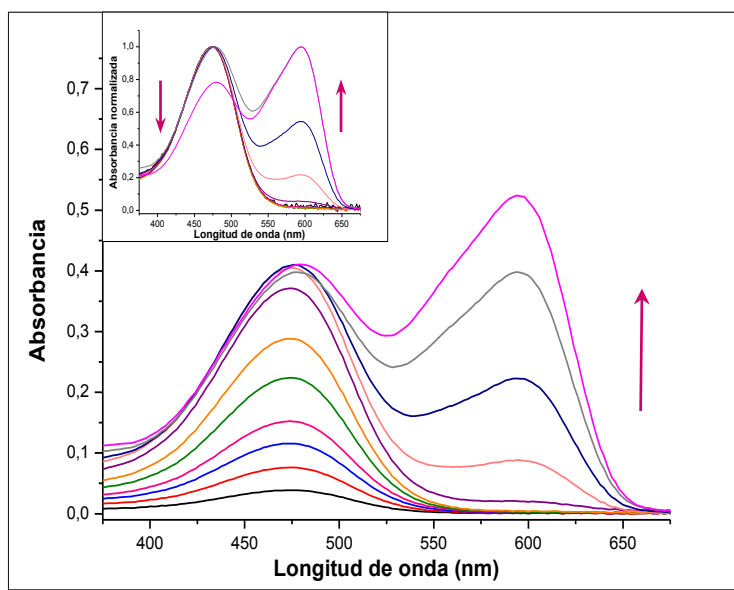


Figura 3.21: Espectros de absorción de CVBr₃ en función de la concentración (1,8 μM - 32,3 μM) en etanol. **Inserto:** Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción.

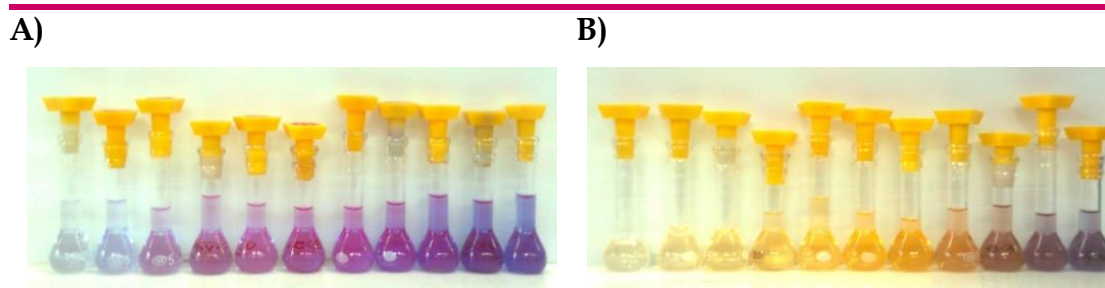


Figura 3.22: Soluciones etanólicas de ambos FS en función de la concentración. **A)** CV; **B)** CVBr₃.

Al igual que lo observado para la Familia de las Azinas, la introducción de sustituyentes voluminosos en la estructura molecular de CV, produjo una disminución de la agregación en solución debido a una razón estérica, conduciendo a características fotofísicas y fotoquímicas mejoradas.^{49,50} La menor agregación presentada por CVBr₃ con respecto al reactivo de partida, evidencia fundamental relevancia ya que esta propiedad disminuye los tiempos de vida de los estados excitados, reduciendo el rendimiento cuántico de formación de ERO.^{21-26,42}

También se ensayó CR en función de la concentración empleando DMF (15,3 μ M - 213,2 μ M) (**Figura 3.23**) y etanol (15,3 μ M - 244,0 μ M) (no se muestran las curvas espectrales). En ambos solventes, éste compuesto evidenció sólo una banda de absorción con un máximo a 514 nm y 520 nm, respectivamente.

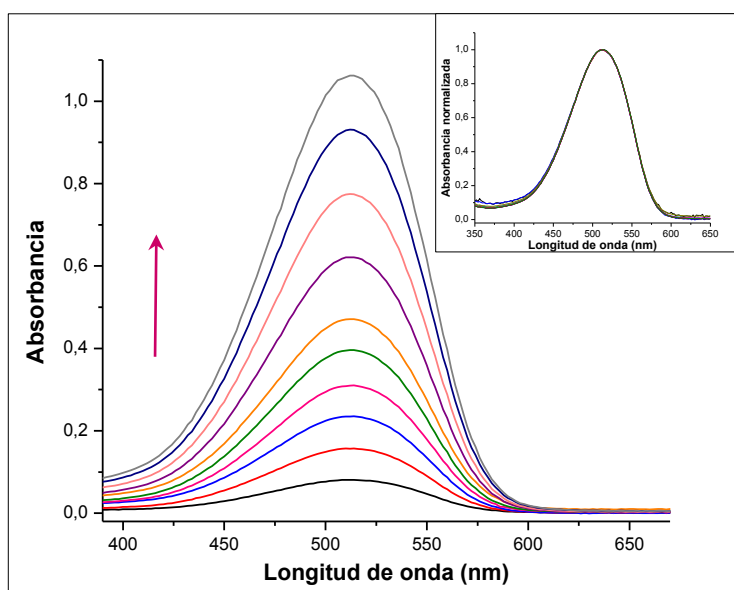


Figura 3.23: Espectros de absorción de CR en función de la concentración (15,3 μ M - 213,2 μ M) en DMF. **Inserto:** Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción.

Además se evaluó en los mismos solventes, el nuevo derivado tribromado, CRBr₃ en función de la concentración (80,7 μ M - 801,7 μ M) presentando una tendencia

similar a CR (**Figura 3.24**). El compuesto CRBr_3 evidenció una única banda de absorción a 502 nm en DMF y a 498 nm en etanol (no se muestran las curvas espectrales). Las bandas evidenciadas en ambos medios, se asignaron a la especie agregada debido a que estos compuestos son neutros y las estructuras moleculares sin carga tienden a agregarse a menores concentraciones que sus análogos cargados.^{6,17,64,65}

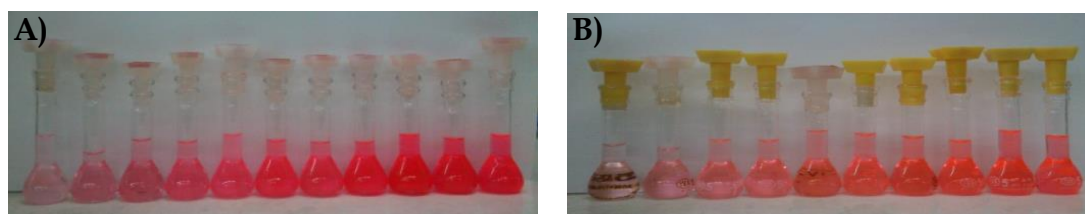


Figura 3.24: Soluciones etanólicas de ambos FS en función de la concentración. A) CR; B) CRBr_3 .

Es importante destacar, que ambos compuestos pertenecientes a la Familia de las Oxazonas, CR y CRBr_3 , se ensayaron a mayores concentraciones que CV y CVBr_3 , lo cual incrementa en gran medida la tendencia a la agregación.^{5,10-12,14}

Además, la banda del monómero de CR y CRBr_3 debería presentarse a menores longitudes de onda, que la correspondiente a CV y CVBr_3 (es decir, desplazada hacia el azul del espectro electromagnético), como consecuencia de que los compuestos de la Familia de las Oxazonas presentan un grupo carbonilo a diferencia de los compuestos de la Familia de las Oxazinas, CV y CVBr_3 , que poseen un grupo amino primario en su estructura. De estos resultados se desprende, que las propiedades de agregación de los compuestos, depende en gran medida de la estructura molecular, acorde con bibliografía.^{5,6,10-12}

3.4.2.2- Desarrollo de cálculos teóricos

Con la finalidad de confirmar las asignaciones realizadas en DMF, se desarrollaron cálculos teóricos de la longitud de onda de máxima absorción, para posteriormente comparar los resultados obtenidos con los determinados experimentalmente para los compuestos. Los cálculos se desarrollaron luego de la optimización inicial de la geometría molecular.

En la **Tabla 3.2** se presenta el estado excitado simulado o teórico (λ_T) y la λ_E de los cuatro compuestos involucrados. Los resultados revelaron que las curvas espectrales calculadas son similares a las obtenidas experimentalmente para CV y CVBr₃. Por su parte, los resultados teóricos determinados para CR y CRBr₃ presentan importantes diferencias con los datos experimentales, corroborando de este modo que la especie monomérica de ambos compuestos no se encuentra presente en solución.

Tabla 3.2: Longitud de onda de máxima absorción experimental (λ_E) y teórica (λ_T) de Oxazinas y Oxazonas en DMF.

Compuesto	λ_E (nm)	λ_T (nm)
CV	482	495,5
CVBr ₃	474	513,9
CR	512	457,2
CRBr ₃	498	468,0

En la **Figura 3.24** se presenta la curva espectral teórica y experimental de CV en DMF (correspondiente a la especie monomérica) y en etanol (asignada al agregado). Es evidente que las bandas monoméricas experimental y calculada son próximas, en tanto que difieren de la curva espectral correspondiente al agregado, confirmando de este modo la asignación monomérica en DMF.

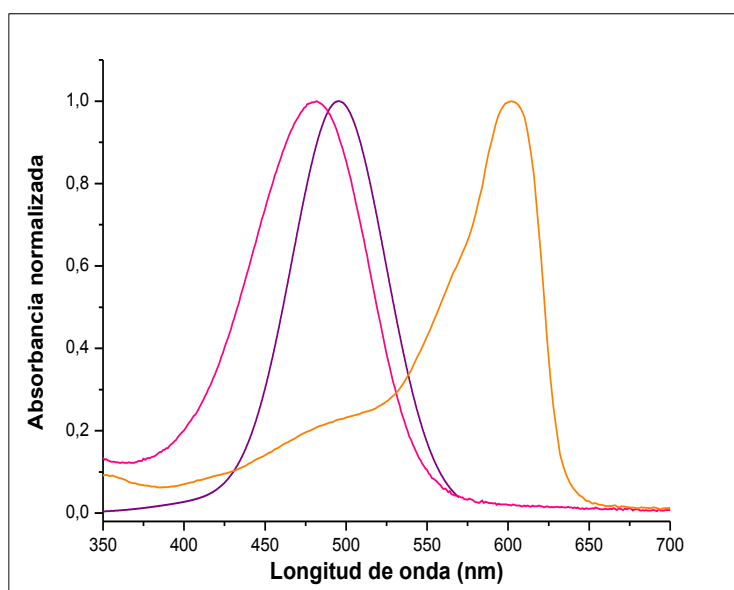


Figura 3.24: Banda de absorción visible teórica y experimental de CV. Espectro teórico del monómero en DMF (—); Espectro experimental del monómero en DMF (—); Espectro experimental del agregado en etanol (—).

3.5- CONCLUSIONES

El fenómeno de agregación de los compuestos químicos presenta consecuencias fundamentales en áreas tan diversas como bioanálisis, diagnósticos médicos y los tratamientos terapéuticos de diversas patologías. La formación de agregados modifica el espectro de absorción y las propiedades fotoquímicas de las moléculas, impactando en la capacidad de emitir a una longitud de onda determinada o de actuar como FS.

Mediante el análisis del efecto de diversas variables sobre las propiedades espectrales de los compuestos involucrados en este trabajo de Tesis Doctoral, se evidenció que diferentes solventes, concentraciones de FS y la sustitución molecular impactan en gran medida en el comportamiento de la agregación. Se abordó un estudio profundo empleando solventes puros y diversas mezclas en función de la concentración de los FS. Esta evaluación, permitió la caracterización de las especies monoméricas en distintos medios, corroborando las asignaciones realizadas mediante cálculos teóricos. También se demostró que los nuevos

derivados bromados, NRBr y CVBr₃, evidenciaron la banda correspondiente al agregado a concentraciones mayores que sus precursores, lo que se atribuyó al impedimento estérico generado por los átomos de bromo presentes en las estructuras. Los resultados obtenidos en estos estudios confirmaron que todos los compuestos ensayados, forman agregados en solución dependiendo significativamente de la concentración de compuesto, tipo y proporción de solvente orgánico. Se demostró además, que en medios de interés farmacéutico, la formación de agregados depende significativamente de la naturaleza química del solvente.

Finalmente, estos ensayos permitieron demostrar que los nuevos derivados bromados NRBr y CVBr₃, evidenciaron una menor agregación con respecto a los reactivos de partida, propiedad de fundamental relevancia para la aplicación en la TFD y la IFD. Los resultados obtenidos sugieren que estos nuevos derivados podrían ser FS prometedores en aplicaciones terapéuticas fotodinámicas.

Agradecimientos

Al Dr. Diego Andrada por su colaboración en el desarrollo de los cálculos teóricos. Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

3.6- BIBLIOGRAFÍA

- [1]- J.C.V. Pais de Moura. Biomedical Application of Dyes. En: H.S. Freeman, A.T. Peters. Editores. Colorants for non-textile applications. 1^{ra} Edición. Elsevier, Applied Science Publishers Ltd. England. 2000; 189-237.
- [2]- L. Patsenker, A. Tatarets, O. Kolosova, O. Obukhova, Y. Povrozin, I. Fedyunyayeva, I. Yermolenko, E. Terpetschnig. Fluorescent Probes and Labels for Biomedical Applications. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1130: 179-187.
- [3]- R.M. El-Shishtawy. Functional Dyes, and Some Hi-Tech Applications. *Int J Photoenergy.* 2009; 2009: 1-21. ID 434897.

- [4]- P. Somani, S. Radhakrishnan. Effect of dye aggregation on the photosensitization effect of conducting polypyrrole sensitized with Prussian Blue. *Mater Chem Phys*. 2001; 70 (2): 150-155.
- [5]- M.K. Goftar, K. Moradi, N.M Kor. Spectroscopic studies on aggregation phenomena of dyes. *Euro J Exp Bio*. 2014; 4 (2): 72-81.
- [6]- A. Chakraborty, R. Adhikari, S.K. Saha. Molecular interaction of oxazine dyes in aqueous solution: Temperature dependent molecular disposition of the aggregates. *J Mol Liq*. 2011; 164 (3) 250-256.
- [7]- V.Y. Petrenko, O.P. Dimitriev, Y.L. Slominskii. Interplay of monomers, dimers and J-aggregates of thiamonomethinecyanine dye with PEDOT and PSS in the dye-PEDOT: PSS composite system. *Synt Met*. 2015; 203: 68-73.
- [8]- O. Valdes-Aguilera, D.C Neckers. Aggregation phenomena in Xanthene dyes. *Acc Chem Res*. 1989; 22 (5): 171-177.
- [9]- R. Giovannetti, L. Alibabaei, L. Petetta. Aggregation behavior of a tetracarboxylic porphyrin in aqueous solution. *J Photochem Photobiol A*. 2010; 211 (2-3) 108-114.
- [10]- A.G. Gilani, M. Moghadam, S.E. Hosseini, M.S. Zakerhamidi. A comparative study on the aggregate formation of two oxazine dyes in aqueous and aqueous urea solutions. *Spectrochim Acta A*. 2011; 83 (1): 100-105.
- [11]- A. Niazia, A. Yazdanipoura, J. Ghasemib, M. Kubista. Spectrophotometric and thermodynamic study on the dimerization equilibrium of ionic dyes in water by chemometrics method. *Spectrochim Acta A*. 2006; 65 (1): 73-78.
- [12]- L. Antonov, G. Gergov, V. Petrov, M. Kubista, J. Nygren. UV-Vis spectroscopic and chemometric study on the aggregation of ionic dyes in water. *Talanta*. 1999; 49 (1) 99-106.
- [13]- A. Chakraborty, M. Ali, S.K. Saha. Molecular interaction of organic dyes in bulk and confined media. *Spectrochim Acta A*. 2010; 75 (5): 1577-1583.
- [14]- A. Ghanadzadeh Gilani, R. Sariri, K. Bahrpaima. Aggregate formation of Rhodamine 6G in anisotropic solvents. *Spectrochim Acta A*. 2001; 57 (1): 155-161.
- [15]- M. Arik, Y. Onganer. Molecular excitons of Pyronin B and Pyronin Y in colloidal silica suspension. *Chem Phys Lett*. 2003; 375 (1-2) 126-133.

- [16]- W.C. Lai, N.S. Dixit, R.A. Mackay. Formation of H aggregates of thionine dye in water. *J Phys Chem.* 1984; 88 (22): 5364-5368.
- [17]- K. Patil, R. Pawar, P. Talap. Self-aggregation of Methylene Blue in aqueous medium and aqueous solutions of Bu₄NBr and urea. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2000; 2 (19): 4313-4317.
- [18]- J. Vicente, J.S. Goulart, M.C.A. Premazzi, A.G.P. Sobrinho, A.A. Silva Neto, M.C.S. Azeredo, J.B. Domingos, F.S. Miranda. H-aggregation of the amphiphilic dye TDPI: Photophysical, electrochemical, DFT and SAXS studies. *J Mol Struct.* 2014; 1063: 320–327.
- [19]- O. Valdes-Aguilera, D.C. Neckers. Rose bengal ethyl ester aggregation in aqueous solution. *J Phys Chem.* 1988; 92 (15): 4286–4289.
- [20]- C.C. Chang, Y.T. Yang, J.C. Yang, H.D. Wu, T. Tsai. Absorption and emission spectral shifts of rose bengal associated with DMPC liposomes. *Dyes Pigments.* 2008; 79 (2): 170-175.
- [21]- T. Nyokong. Effects of substituents on the photochemical and photophysical properties of main group metal phthalocyanines. *Coord Chem Rev.* 2007; 251 (13-14): 1707-1722.
- [22]- S.J. Mora, M.P. Cormick, M.E. Milanesio, E.N. Durantini. The photodynamic activity of a novel porphyrin derivative bearing a fluconazole structure in different media and against *Candida albicans*. *Dyes Pigments.* 2010; 87 (3): 234–240.
- [23]- L.P. Aggarwal, I.E. Borissevitch. On the dynamics of the TPPS4 aggregation in aqueous solutions: Successive formation of H and J aggregates. *Spectrochim Acta A.* 2006; 63 (1): 227-233.
- [24]- K.T. Arun, B. Epe, D. Ramaiah. Aggregation behavior of halogenated squaraine dyes in buffer, electrolytes, organized media, and DNA. *J Phys Chem B.* 2002; 106 (44): 11622-11627.
- [25]- C.K. Lim, J. Heo, S. Shin, K. Jeong, Y.H. Seo, W.D. Jang, C.R. Park, S.R. Park, S. Kim, I.C. Kwon. Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of Cancer. *Cancer Lett.* 2013; 334 (2): 176-187.

- [26]- C.C. Chang, M.C. Hsieh, J.C. Lin, T.C. Chang. Selective photodynamic therapy based on aggregation-induced emission enhancement of fluorescent organic nanoparticles. *Biomaterials*. 2012; 33 (3): 897-906.
- [27]- Y.N. Konan, R. Gurny, E. Allémann. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2002; 66 (2): 89-106.
- [28]- A. Ghanadzadeh Gilani, M. Moghadama, M.S. Zakerhamidib. Dimeric spectra analysis in Microsoft Excel: A comparative study. *Comput Meth Prog Bio*. 2011; 104 (2): 175-181.
- [29]- P. Zimcik, M. Miletin, Z. Musil, K. Kopecky, L. Kubza, D. Brault. Cationic azaphthalocyanines bearing aliphatic tertiary amino substituents-Synthesis, singlet oxygen production and spectroscopic studies. *J Photochem Photobiol A*. 2006; 183 (1-2): 59-69.
- [30]- P. Zimcik, M. Miletin, H. Radilova, V. Novakova, K. Kopecky, J. Svec, E. Rudolf. Synthesis, properties and in vitro photodynamic activity of water-soluble azaphthalocyanines and azanaphthalocyanines. *Photochem Photobiol*. 2010; 86 (1): 168-175.
- [31]- V. Gadenne, M. Bayo-Bangoura, L. Porte, L. Patrone. Solvent induced aggregation of protoporphyrin and octacarboxylphthalocyanine of zinc deposited on gold surface. *J Colloid Interface Sci*. 2011; 359 (1) 47-55.
- [32]- V. Blažek, K. Mlinarić-Majerski, W. Qin, N Basarić. Photophysical study of the aggregation of naphthyl-, anthryl- and pyrenyl-adamantanebisurea derivatives. *J Photochem Photobiol A*. 2012; 229 (1) 1-10.
- [33]- S. Arslan, I. Yilmaz. A new water-soluble metal-free phthalocyanine substituted with naphthoxy-4-sulfonic acid sodium salt. Synthesis, aggregation, electrochemistry and in situ spectroelectrochemistry. *Polyhedron*. 2007; 26 (12): 2387-2394.
- [34]- J.W. Millard, F.A. Alvarez-Núñez, S.H. Yalkowsky. Solubilization by cosolvents. Establishing useful constants for the log-linear model. *Int. J. Pharm*. 2002; 245 (1-2): 153-166.

- [35]- Kabir-ud-Din, Z. Yaseen, M.S. Sheikh. Modulation of aggregation behavior of amphiphilic drug AMT under the influence of polymer molecular weight and composition. *Colloid. Surface B.* 2011; 87 (2): 340-345.
- [36]- P. Dutta, R. Rai, S. Pandey. Effect of ionic liquid on J-aggregation of meso-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin within aqueous mixtures of poly(ethylene glycol). *J Phys Chem B.* 2011; 115 (13): 3578-3587.
- [37]- A. Gorman, J. Killoran, C. O'Shea, T. Kenna, W.M. Gallagher, D.F. O'Shea. In vitro demonstration of the heavy-atom effect for photodynamic therapy. *J Am Chem Soc.* 2004; 126 (34): 10619-10631.
- [38]- T. Yogo, Y. Urano, Y. Ishitsuka, F. Maniwa, T. Nagano. Highly efficient and photostable photosensitizer based on BODIPY chromophore. *J Am Chem Soc.* 2005; 127 (35): 12162-12163.
- [39]- F.A.B. dos Santos, A.F. Uchoa, M.S. Baptista, Y. Iamamoto, O.A. Serra, T.J. Brocksom, K.T. de Oliveira. Synthesis of functionalized chlorins sterically-prevented from self-aggregation. *Dyes Pigments.* 2013; 99 (2): 402-411.
- [40]- P. Zimcik, M. Miletin, K. Kopecky, Z. Musil, P. Berka, V. Horakova, H. Kucerova, J. Zbytovska, D. Brault. Influence of aggregation on interaction of lipophilic, water-insoluble azaphthalocyanines with DOPC vesicles. *Photochem Photobiol.* 2007; 83 (6): 1497-1504.
- [41]- J. Shi, Z. Chai, C. Zhong, W. Wu, J. Hua, Y. Dong, J. Qin, Q. Li, Z. Li. New efficient dyes containing *tert*-butyl in donor for dye-sensitized solar cells. *Dyes Pigments.* 2012; 95 (2): 244-251.
- [42]- M. Kostka, P. Zimcik, M. Miletin, P. Klemra, K. Kopecky, Z. Musil. Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines. *J Photochem Photobiol A.* 2006; 178 (1): 16-25.
- [43]- S. Bayar, H.A. Dinçer, E. Gonca. The synthesis of some phthalocyanines derived from bulky substituted phthalonitriles. *Dyes Pigments.* 2009; 80 (1) 156-162.

- [44]- V. Kumar, G.A. Baker, S. Pandey, S.N. Baker, S. Pandey. Contrasting behavior of classical salts versus ionic liquids toward aqueous phase J-aggregate dissociation of a cyanine dye. *Langmuir*. 2011; 27 (21): 12884-12890.
- [45]- S. De, S. Das, A. Girigoswami. Environmental effects on the aggregation of some xanthene dyes used in lasers. *Spectrochim Acta A*. 2005; 61 (8): 1821-1833.
- [46]- D.K. Chatterjee, L.S. Fong, Y. Zhang. Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008; 60 (15): 1627-1637.
- [47]- A.R. Monahan, N.J. Germano, D.F. Blossey. The Aggregation of Arylazonaphthols II. Steric Effects on Dimer Structure in Water. *J Phys Chem*. 1971; 76 (9): 1227-1233.
- [48]- S.J. Isak, E.M. Eyring. Fluorescence quantum yield of cresyl violet in methanol and water as a function of concentration. *J Phys Chem*. 1992; 96 (4): 1738-1742.
- [49]- S. Wei, J. Zhou, D. Huang, X. Wang, B. Zhang, J. Shen. Synthesis and Type I/Type II photosensitizing properties of a novel amphiphilic zinc phthalocyanine. *Dyes Pigments*. 2006; 71 (1): 61-67.
- [50]- P. Zimcik, M. Miletin, J. Ponec, M. Kostka, Z. Fiedler. Synthesis and studies on photodynamic activity of new water-soluble azaphthalocyanines. *J Photochem Photobiol A*. 2003; 155 (1-3): 127-131.
- [51]- D. Bechet, P. Couleaud, C. Frochot, M.L. Viriot, F. Guillemain, M. Barberi-Heyob. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends Biotechnol*. 2008; 26 (11): 612-621.
- [52]- D. Wróbel, A. Siejak, P. Siejak. Photovoltaic and spectroscopic studies of selected halogenated porphyrins for their application in organic solar cells. *Sol Energ Mat Sol C*. 2010; 94 (3): 492-500.
- [53]- A.R. Monahan, D.F. Blossey. The aggregation of Arylazonaphthols I. Dimerization of bonadur red in aqueous and methanolic systems. *J Phys Chem*. 1970; 74 (23): 4014-4021.
- [54]- J. Ghasemi, A. Niazi, M. Kubista. Thermodynamics study of the dimerization equilibria of rhodamine B and 6G in different ionic strengths by

photometric titration and chemometrics method. *Spectrochim Acta A*. 2005; 62 (1-3): 649-656.

[55]- M.K. Singh, H. Pal, A.C. Bhasikuttan, A.V. Sapre. Photophysical properties of the cationic form of neutral red. *Photochem Photobiol*. 1999; 69 (5): 529-535.

[56]- J. Goicoechea, F.J. Arregui, J.M. Corres, I.R. Matias. Study and optimization of self-assembled polymeric multilayer structures with neutral red for pH sensing applications. *J. Sensors*. 2008; 2008: 1-7. ID 142854.

[57]- S.M. Chen, K.C. Lin. The electrocatalytic properties of polymerized neutral red film modified electrodes. *J Electroanal Chem*. 2001; 511 (1-2): 101-114.

[58]- C. Johnson, S. B. Darling and Y. You. Density functional theory as a guide for the design of pyran dyes for dye-sensitized solar cells. *Monatsh Chem*. 2011; 142 (1): 45-52.

[59]- S.R. Stoyanov, C.X. Yin, M.R. Gray, J.M. Stryker, S. Gusarov, A. Kovalenko. Computational and experimental study of the structure, binding preferences, and spectroscopy of nickel(II) and vanadyl porphyrins in petroleum. *J Phys Chem B*. 2010; 114 (6): 2180-2188.

[60]- T. Etienne, L. Chbib, C. Michaux, E.A. Perpète, X. Assfeld, A. Monari. All-organic chromophores for dye-sensitized solar cells: A theoretical study on aggregation. *Dyes Pigments*. 2014; 101: 203-211.

[61]- W. Leng, A.M. Kelley. Resonance raman intensity analysis of cresyl violet bound to SiO₂ colloidal nanoparticles. *Langmuir*. 2003; 19 (17): 7049-7055.

[62]- A. Jafari, A. Ghanadzadeh, H. Tajalli, M. Yeganeh, M. Moghadam. Electronic absorption spectra of Cresyl violet acetate in anisotropic and isotropic solvents. *Spectrochim Acta A*. 2007; 66 (3): 717-725.

[63]- M. Miranda, M.G. Lagorio, E. San Román. Photophysics on surfaces: Determination of absolute fluorescence quantum yields from reflectance spectra. *Langmuir*. 2004; 20 (9): 3690-3697.

[64]- N. A. Kuznetsova, N. S. Gretsova, V. M. Derkacheva, S. A. Mikhalenko, L. I. Soloveva, O. A. Yuzhakova, O. L. Kaliya, E. A. Lukyanets. Generation of singlet oxygen with anionic aluminum phthalocyanines in Water. *Russ J Gen Chem*. 2002; 72 (2): 300-306.

[65]-V.T. Verdree, S. Pakhomov, G. Su, M.W. Allen, A.C. Countryman, R.P. Hammer, S.A. Soper. Water soluble metallo-phthalocyanines: The role of the functional groups on the spectral and photophysical properties. *J Fluoresc.* 2007; 17 (5): 547-563.



CAPÍTULO 4

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

Y FOTOQUÍMICAS



ÍNDICE CAPÍTULO 4

4.1- INTRODUCCIÓN.....	151
4.1.1- Constante de Disociación Ácido-Base.....	151
4.1.2- Coeficiente de Partición.....	152
4.1.2.1- Generalidades.....	152
4.1.2.2- Determinación experimental de la lipofilicidad.....	153
4.1.2.3- Determinación de la lipofilicidad mediante cálculos teóricos	155
4.1.2.4- Impacto de la lipofilicidad en Fotosensibilizadores.....	155
4.1.3- Estabilidad Química y Fotoquímica.....	156
4.1.4- Oxígeno Singlete.....	157
4.1.4.1- Procesos Fotofísicos.....	157
4.1.4.2- Procesos Fotoquímicos.....	159
4.1.4.3- Procesos fotofísicos y fotoquímicos: Impacto del “efecto del átomo pesado” y la agregación molecular.....	162
4.1.4.4- Reacción de fotooxidación de 9,10-dimetilantraceno.....	163
4.2- OBJETIVOS.....	164
4.3- MATERIALES Y MÉTODOS.....	165
4.3.1- Materiales.....	165
4.3.2- Equipamiento.....	166
4.3.3- Procedimientos generales.....	167
4.3.3.1- Constante de Disociación Ácido-Base.....	167

4.3.3.2- <i>Coeficiente de Partición</i>	169
4.3.3.2.1- <i>Determinación de log P_{HPLC}</i>	169
4.3.3.2.2- <i>Cálculo teórico de log P</i>	170
4.3.3.3- <i>Estabilidad Química y Fotoestabilidad</i>	172
4.3.3.4- <i>Oxígeno Singlete</i>	173
4.4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	174
4.4.1- Constante de Disociación Ácido-Base	174
4.4.2- Coeficiente de Partición	179
4.4.2.1- <i>Determinación de log P_{HPLC}</i>	179
4.4.2.2- <i>Cálculo teórico de log P</i>	183
4.4.3- Estabilidad Química y Fotoquímica	185
4.4.3.1- <i>Estudios de Estabilidad Química</i>	185
4.4.3.2- <i>Estudios de Fotoestabilidad</i>	190
4.4.4- Oxígeno Singlete	194
4.4.4.1- <i>Familia de las Azinas</i>	194
4.4.4.2- <i>Familia de las Oxazinas y Oxazonas</i>	197
4.5- CONCLUSIONES	200
4.6- BIBLIOGRAFÍA	201

4.1- INTRODUCCIÓN

La evaluación de las propiedades fisicoquímicas de un fármaco, es fundamental durante el proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevas entidades químicas, ya que son parámetros críticos que impactan directamente en la interacción con sistemas biológicos.^{1,2}

Durante la etapa temprana del desarrollo de fármacos, un gran número de entidades químicas novedosas se someten a una estricta selección, en orden de revelar su actividad biológica. En esta instancia, se investigan las propiedades fisicoquímicas, ya que condicionan numerosos procesos y determinan la actividad. La evaluación de las propiedades fisicoquímicas contribuye de manera sólida a la definición de relaciones estructura-actividad y permite predecir potenciales problemas relativos a la farmacocinética o la formulación farmacéutica de los nuevos candidatos.^{1,2}

4.1.1- Constante de Disociación Ácido-Base

La especie no ionizada de numerosos fármacos es la forma más liposoluble, capaz de difundir de manera pasiva a través de membranas biológicas. La mayoría de los compuestos que presentan actividad biológica son ácidos y/o bases débiles, siendo relevante destacar el impacto de la constante de disociación ácido-base (pK_a) y el pH del medio.²⁻⁴ Esto es particularmente importante en los sistemas fisiológicos, donde el grado de ionización de la molécula influye en la velocidad de difusión a través de las diferentes membranas celulares.⁴ Siendo que el pH del medio determina cada especie en solución, el pK_a de los compuestos tiene una importancia fundamental.^{3,5}

El valor de pK_a de una molécula impacta en la lipofilicidad, solubilidad, permeabilidad y unión a proteínas, siendo estos parámetros, determinantes en la captación y localización celular. Este parámetro fisicoquímico es clave en un fármaco, ya que afecta numerosas características biofarmacéuticas, impactando

directamente en propiedades farmacocinéticas tales como absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME).^{3,4,6,7}

Al considerar un compuesto como FS, es necesario conocer la naturaleza de las especies presentes en solución en función del pH del medio, ya que la ionización molecular induce variaciones muy importantes en los espectros de absorción y emisión, impactando directamente en su capacidad de actuar como FS.^{4,8,9} Además, es importante destacar, que las modificaciones estructurales son determinantes, ya que la incorporación de un protón a la estructura molecular podría modificar la biodistribución del FS *in vivo*.^{3,6,8} En este contexto, el pH del medio es de importancia fundamental, ya que puede afectar la solubilidad, lipofilidad, transporte pasivo y la agregación, entre otras propiedades fisicoquímicas.^{5,7}

En particular, se ha reportado el valor de pK_a del compuesto NR ($pK_a=6,8$),¹⁰⁻¹⁴ el cual está dentro del intervalo de pH fisiológico, transformándolo en un FS muy interesante. Esta propiedad permitió numerosas aplicaciones biológicas, ya que el compuesto evidencia cambios característicos en su coloración y fluorescencia, dependientes del pH del medio.¹⁵ En soluciones de pH cercanos al fisiológico, coexisten las dos especies de NR, la forma neutra y la protonada, que surge como consecuencia de la unión de un protón al átomo de nitrógeno central del heterociclo. Esta especie, de color rojo, es la forma que predomina en la mayoría de las aplicaciones biológicas, lo que explica el nombre trivial de este compuesto.¹⁵

A partir de los cambios espectrales que se producen en función del pH, es factible determinar los valores de pK_a mediante el registro de los espectros UV-Visible.^{5,16}

4.1.2- Coeficiente de Partición

4.1.2.1- Generalidades

La lipofilidad es la tendencia de un compuesto a distribuirse entre una fase acuosa y un solvente orgánico no polar inmiscible.¹⁷ Las propiedades lipofílicas

de una molécula desempeñan un rol fundamental en la penetración de la membrana celular, la solubilidad, la unión a albúmina sérica, los procesos de absorción en los sistemas biológicos, la interacción fármaco-receptor y la penetración en el sistema nervioso central.^{18,19}

El coeficiente de partición de una molécula neutra que se encuentra en equilibrio entre dos solventes inmiscibles (P) es la medida de lipofilidad más utilizada en modelos biológicos de partición/distribución.^{17,19,20} El solvente orgánico *n*-octanol es empleado con mayor frecuencia, siendo el logaritmo del coeficiente de partición *n*-octanol-agua ($\log P_{O/W}$) el parámetro de lipofilidad más empleado y comúnmente aceptado.^{19,20}

La lipofilidad de un candidato a fármaco es uno de los parámetros moleculares más importantes para la evaluación de la relación entre las propiedades fisicoquímicas y la actividad biológica.^{17,18} Éste parámetro permite predecir la captación celular, biodisponibilidad y toxicidad, estableciendo una estrecha correlación con el transporte a través de membranas biológicas. Además, diversos estudios han demostrado que el incremento de la lipofilidad molecular se puede correlacionar con el aumento de la actividad biológica.^{18,21-24}

4.1.2.2- Determinación experimental de la lipofilidad

Entre los diferentes métodos empleados para la determinación de la lipofilidad, el procedimiento clásico es el método de la ampolla, que implica el control de numerosos detalles experimentales.^{18,25-27} Este procedimiento es laborioso, presenta baja reproducibilidad y requiere gran cantidad de muestra con alto grado de pureza.^{17,20} Además, se caracteriza por numerosas limitaciones técnicas, en particular, asociadas a la evaluación de compuestos con alto valor de $\log P_{O/W}$ ($\geq 6,5$), insolubles o inestables en agua.^{17,18,26,27} Además, el método de la ampolla evidencia diversas dificultades que impactan directamente en la confiabilidad de los resultados obtenidos, como la formación de emulsiones estables con posterioridad a la agitación, la interferencia del solvente o impurezas y prolongados tiempos de análisis.^{17,18}

Considerando las desventajas que ha demostrado el procedimiento tradicional para la determinación de la lipofilicidad, se han propuesto numerosos métodos alternativos que emplean técnicas de cromatografía líquida en fase reversa, como la cromatografía en capa delgada (RP-TLC) y la cromatografía líquida de alta eficiencia (RP-HPLC).^{20,28} Éstos métodos cromatográficos son técnicas interesantes y ampliamente desarrolladas para la determinación de la lipofilicidad de diversos fármacos y compuestos biológicamente activos.¹⁸

Es ampliamente conocido que la retención que experimenta un compuesto en cromatografía líquida en fase reversa es el principal indicador de un proceso de partición verdadero, ya que este parámetro se relaciona directamente con la distribución del compuesto entre la fase móvil y la fase estacionaria.^{19,28} Ésta situación se rige por la lipofilicidad/hidrofobicidad del compuesto, permitiendo establecer una correlación con el coeficiente de partición *n*-octanol-agua.^{18,19,27}

Las técnicas cromatográficas ofrecen numerosas ventajas con respecto a otros procedimientos, en particular la rapidez y sensibilidad de los análisis. Estas metodologías se caracterizan por ser simples y brindar resultados con buena precisión y alta reproducibilidad.^{25,26,28,29} También permiten determinar un amplio intervalo de valores de lipofilicidad y requieren sólo una pequeña cantidad de muestra, considerando que las impurezas presentes no interfieren en las mediciones, ya que es habitual que se separen fácilmente durante el proceso cromatográfico.^{17-19,25,28,29} Además, el solvente empleado en la preparación de la muestra de interés también se separa, por lo que la baja solubilidad del compuesto no interfiere en las mediciones. Es importante destacar, que las ventajas asociadas a estas técnicas son fundamentales en la etapa temprana del desarrollo de fármacos.^{18,19}

Las metodologías que emplean HPLC se desarrollan comúnmente utilizando como fase estacionaria columnas de fase reversa de alta eficiencia, las cuales dan origen a procesos robustos y reproducibles, en tanto que con relación a la composición de la fase móvil es necesario considerar diversas proporciones del solvente orgánico.¹⁹ De este modo, para una determinación cromatográfica exitosa de la lipofilicidad, se debe establecer una relación lineal entre los

parámetros de retención del compuesto de interés y la concentración de solvente orgánico en la fase móvil acuosa.^{20,28}

Es importante destacar que actualmente RP-HPLC es considerada una valiosa herramienta y una de las metodologías más ventajosas para la determinación del coeficiente de partición, estableciendo una alta correlación entre las mediciones realizadas aplicando esta técnica y los datos obtenidos mediante el empleo del método de la ampolla.^{17,25,27,30}

4.1.2.3- Determinación de la lipofilidad mediante cálculos teóricos

En conexión con el notable desarrollo de la tecnología computacional para el diseño racional de fármacos, la predicción o estimación de propiedades moleculares de compuestos químicos con potencial uso farmacéutico, ha atraído a numerosos investigadores de diferentes campos.^{30,31}

Considerando que la lipofilidad se identifica como una de las propiedades moleculares más importantes, diversos *software* y módulos de internet permiten desarrollar el cálculo de los valores de lipofilidad mediante el empleo de diferentes algoritmos. Todos ellos requieren previamente el ingreso de la estructura molecular, empleando usualmente HyperChem, y la optimización mediante la mecánica molecular de campo de fuerza MM⁺.¹⁷ Estos programas de cálculos *in silico*, permiten la estimación computarizada de la lipofilidad, frecuentemente basados en el método de los fragmentos, posibilitando el empleo de este parámetro fisicoquímico en modelos predictivos para las propiedades ADME.^{19,25,27,28}

4.1.2.4- Impacto de la lipofilidad en Fotosensibilizadores

Al considerar compuestos FS ampliamente estudiados, como MB y *Toluidine Blue O* (Familia de las Tiazinas), se evidencia que son altamente hidrófilos, presentando valores de $\log P_{O/W} < 0$ y cortos tiempos de vida media farmacológica. La elevada solubilidad acuosa que los caracteriza, actúa como una

barrera para la partición lipídica, conduciendo a una baja captación celular de los mismos. Si bien, los compuestos Tiazínicos comerciales presentan una elevada hidrofiliidad, modificaciones simples en la estructura molecular, como la introducción de grupos alquilo, han producido un aumento de la lipofiliidad conduciendo al incremento de la captación celular.^{22,32}

El carácter lipofílico de las moléculas se asocia con compuestos que presentan $\log P_{O/W} > 1,5$; considerando como anfifílicos a aquellos con valores intermedios ($\log P_{O/W}$ entre 0 y 1,5). Las moléculas FS con altos valores de lipofiliidad ($P_{O/W} > 1,5$) pueden evidenciar situaciones problemáticas debido a su baja solubilidad en medios acuosos, condición que es posible revertir mediante el empleo de cosolventes apropiados o formulaciones liposomales. Como consecuencia, es relevante destacar que los compuestos FS requieren un equilibrio de carácter lipofílico/hidrofílico para una actividad biológica exitosa.^{22,32}

Con relación a los FS desarrollados y evaluados en este trabajo de Tesis Doctoral, cabe indicar que los valores de $\log P_{O/W}$ de los compuestos precursores, CV y NR, están reportados en literatura, siendo los mismos de 2,83 y 3,20; respectivamente.^{33,34}

4.1.3- Estabilidad Química y Fotoquímica

La estabilidad y fotoestabilidad de un medicamento son factores esenciales en la calidad, seguridad y eficacia, ya que una pequeña alteración en las propiedades físicas o químicas de una molécula puede impactar en la acción terapéutica del producto farmacéutico.^{24,35} El propósito de los estudios de estabilidad y fotoestabilidad es demostrar la influencia de una variedad de factores ambientales tales como el entorno químico, la temperatura y la luz. Los mismos, permiten conocer la reactividad y la manipulación segura de los nuevos compuestos, proporcionando las condiciones óptimas de almacenamiento.³⁶

Con relación a la estabilidad química, los FS deben ser resistentes a la descomposición a fin de actuar de manera eficaz. Luego de la administración, es importante que la molécula no sea transformada por procesos hidrolíticos o la

acción de ciertas enzimas, tales como proteasas o esterases. Los grupos cromóforos de los FS son habitualmente entidades estables, sin embargo, las cadenas laterales pueden ser modificadas mediante vías oxidativas, como por ejemplo, *N*- u *O*- desalquilación.³²

La estabilidad fotoquímica de las sustancias farmacéuticas es una propiedad relevante ya que la luz puede conducir a la pérdida de la potencia del fármaco, causando la formación de productos de degradación fototóxicos.^{37,38}

La fotodegradación de los compuestos FS, como resultado de la irradiación del sitio diana durante el proceso de fotosensibilización, es aceptable considerando la ausencia de productos de degradación tóxicos, lo cual conduciría a minimizar los fotoefectos posteriores al tratamiento.³² Debido a que los FS son compuestos químicos que requieren luz para su activación, la evaluación de la fotoestabilidad permitirá predecir la posible degradación *in vivo* de los nuevos compuestos.^{38,39}

Durante el desarrollo de estudios de estabilidad y fotoestabilidad es crítico la selección del método analítico, el cual debe permitir la evaluación simultánea del compuesto y sus productos de degradación.^{35,36}

4.1.4- Oxígeno Singlete

4.1.4.1- Procesos Fotofísicos

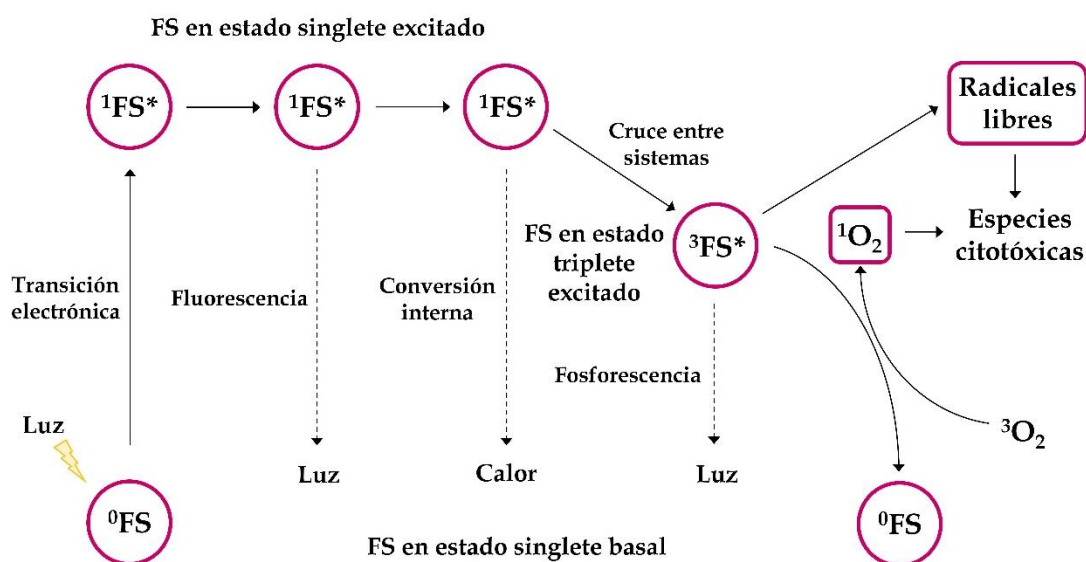
Los dos aspectos más importantes en la actividad fotodinámica, son los procesos de absorción y transferencia de energía. La acción fotodinámica se inicia con la absorción de un fotón por la molécula FS, seguido de diversas reacciones competitivas radiativas y no radiativas.^{40,41}

El compuesto en estado ⁰FS presenta dos electrones con espines opuestos y baja energía molecular orbital. La absorción de luz en forma de fotones, desencadena la formación de un FS electrónicamente excitado, como consecuencia de que un electrón es impulsado a un orbital de mayor energía, manteniendo su giro desde el estado basal. Este nuevo estado, es el ¹FS* y considerando que presenta cortos tiempos de vida (nanosegundos) es previsible un pequeño efecto fotodinámico,

ya que la interacción con las moléculas circundantes de los sistemas biológicos es relativamente insignificante (**Esquema 4.1**).⁴⁰⁻⁴³

El estado $^1\text{FS}^*$ puede retornar al ^0FS participando en un proceso radiativo, mediante la emisión singlete-singlete denominada fluorescencia o por conversión interna en calor.^{40,41,43}

El $^1\text{FS}^*$ puede someterse además, a un proceso no radiativo conocido como cruce entre sistemas (CES), mediante el cual el espín del electrón excitado se invierte para formar el estado $^3\text{FS}^*$ de menor energía (**Esquema 4.1**).^{40,41,43} Es importante destacar que numerosos FS evidencian alta eficiencia cuántica para esta transición, siendo una característica clave para un buen compuesto FS.⁴²



Esquema 4.1: Representación gráfica de los procesos fotofísicos y fotoquímicos.

El estado $^3\text{FS}^*$ presenta tiempos de vida significativamente mayores (microsegundos a milisegundos) que los determinados para las especies en estado $^1\text{FS}^*$, como consecuencia de que los electrones giran en una conformación paralela.⁴¹ La energía de las especies en estado $^3\text{FS}^*$ se puede disipar mediante una vía radiativa de emisión triplete-singlete, denominada fosforescencia

(Esquema 4.1).⁴⁰⁻⁴² Ésta pérdida de energía, es un proceso que se conoce como “transición prohibida” ya que el FS se convertiría directamente desde un estado $^3\text{FS}^*$ a un estado $^1\text{FS}^*$, determinando el tiempo de vida del $^3\text{FS}^*$.⁴³

Si bien el estado $^1\text{FS}^*$ presenta un tiempo de vida corto para producir un importante daño biológico, el rol principal durante el proceso de fotosensibilización es actuar como precursor del $^3\text{FS}^*$.⁴⁴

4.1.4.2- Procesos Fotoquímicos

Como consecuencia de un tiempo de vida largo, el estado $^3\text{FS}^*$ fotoactivo, puede participar en una serie de reacciones que generan diversas especies citotóxicas (Esquema 4.1). Así, el efecto fotodinámico se debe principalmente a la transferencia de energía o electrones del $^3\text{FS}^*$ al oxígeno molecular o un sustrato orgánico.^{41,44} En general, se acepta que las especies citotóxicas durante la actividad fotodinámica, se producen cuando el FS está en el estado $^3\text{FS}^*$.⁴¹

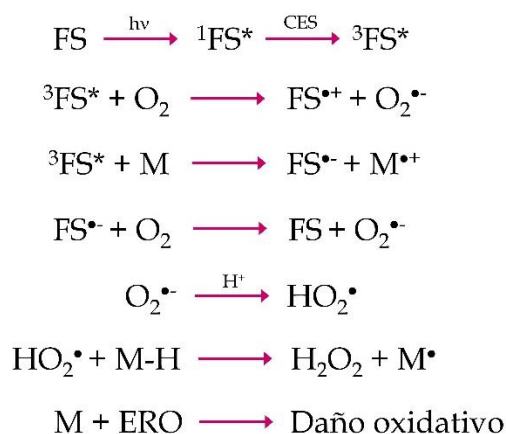
Es ampliamente conocido que el estado $^3\text{FS}^*$ puede participar en dos tipos principales de reacciones, las denominadas Tipo I y Tipo II, las cuales conducen a un daño biológico oxidativo irreversible del tejido circundante.⁴¹

Las reacciones Tipo I generalmente implican la producción inicial de anión superóxido como consecuencia de la transferencia de electrones desde el estado $^3\text{FS}^*$ al oxígeno molecular, lo que conduce a una reducción monovalente.^{43,44} El anión superóxido no evidencia alta reactividad en sistemas biológicos, por lo que no produce gran daño oxidativo. Sin embargo, puede reaccionar con sí mismo para producir peróxido de hidrógeno y oxígeno, reacción conocida como dismutación, que puede ser catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD). El ión superóxido puede además, reducir iones metálicos que actuarán como catalizadores al convertir el peróxido de hidrógeno en radicales hidroxilos, altamente reactivos. Esta reacción, denominada reacción de Fenton, presenta gran relevancia en sistemas biológicos ya que la mayoría de las células contienen un cierto nivel de hierro, cobre u otros metales, que pueden catalizar esta reacción.^{43,45}

Posteriormente, el anión superóxido puede reaccionar con el radical hidroxilo, dando origen al $^1\text{O}_2$, o puede interactuar con óxido nítrico para producir peroxinitrito, otro anión oxidante altamente reactivo.⁴³

Por su parte, el radical hidroxilo puede interactuar con un sustrato orgánico, por ejemplo, un ácido graso, dando origen a un aducto hidroxilado, que es en sí mismo un radical. Además, puede oxidar diversos sustratos orgánicos mediante la abstracción de un electrón, siendo el producto oxidado resultante un radical, que puede interactuar en cadena con otras moléculas. Por ejemplo, podría reaccionar con oxígeno en estado fundamental para producir un radical peroxilo altamente reactivo, que permite continuar con las reacciones en cadena.^{43,45}

Las principales reacciones Tipo I se resumen en el **Esquema 4.2**.



Esquema 4.2: Principales reacciones involucradas en un proceso Tipo I, donde M representa un sustrato biológico.

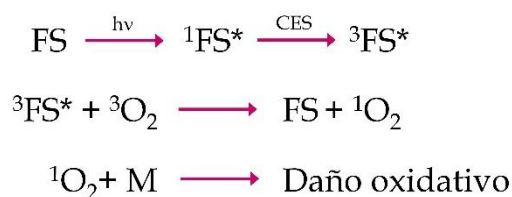
Es importante destacar que en una vía Tipo I, el ${}^3\text{FS}^*$ puede reaccionar directamente con un sustrato, tal como la membrana celular o una molécula, mediante la transferencia de un protón o un electrón para formar un catión radical o un anión radical, respectivamente. Estas especies pueden reaccionar adicionalmente con oxígeno para generar ERO^{40,41,43}

Por su parte, las reacciones Tipo II involucran la interacción entre el $^3\text{FS}^*$ y el oxígeno molecular en estado triplete fundamental ($^3\text{O}_2$), generalmente mediante la transferencia de energía. Esto conduce a la formación de $^1\text{O}_2$, el cual es altamente electrofílico y reacciona con numerosas moléculas biológicas, incluyendo lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.^{40,41,43-46}

El $^1\text{O}_2$ es un importante producto intermedio reactivo en numerosas oxidaciones fotoinducidas y es considerado la principal especie citotóxica en la actividad fotodinámica, ya que es capaz de oxidar directamente dobles enlaces presentes en diversas moléculas biológicas.^{41,44-47}

Una estrategia de diseño para que nuevos FS actúen mediante reacciones de Tipo II, consiste en introducir grupos funcionales que faciliten el CES.⁴⁷

Las reacciones involucradas en la vía Tipo II se detallan en el **Esquema 4.3**.



Esquema 4.3: Principales reacciones involucradas en un proceso Tipo II, donde M representa un sustrato biológico.

Las ERO generadas por procesos Tipo I y Tipo II, son responsables de los daños irreversibles causados en las membranas celulares, plasma, mitocondrias y lisosomas.⁴⁴ Estas especies reactivas son capaces de oxidar biomoléculas tales como aminoácidos (constituyentes de las proteínas), nucleótidos (constituyentes del ADN y ARN) y lípidos insaturados, induciendo como consecuencia a la muerte celular.⁴³

Las reacciones Tipo I y Tipo II pueden ocurrir simultáneamente y la relación entre estos procesos depende de las características del FS implicado, como así también, de las concentraciones de sustrato y oxígeno molecular.^{40,43} No es sencillo

establecer el mecanismo que prevalece *in vivo*, siendo importante destacar que ambos procesos conducen en última instancia, a la muerte celular.⁴⁶

Debido a la alta reactividad y el tiempo de vida corto de las especies reactivas generadas, sólo las moléculas y estructuras que se encuentran próximas a la zona de su producción, serán las afectadas, produciendo la muerte del tejido diana con daño escaso o nulo en los tejidos circundantes normales.^{40,44}

Se ha reportado que en condiciones de ausencia de oxígeno molecular, el FS puede interactuar con sustratos mediante una vía conocida como Tipo III.⁴⁸

4.1.4.3- Procesos fotofísicos y fotoquímicos: Impacto del “efecto del átomo pesado” y la agregación molecular

Un método bien establecido que produce un incremento en la eficiencia fotosensibilizante, se vale del denominado “efecto del átomo pesado” como consecuencia del aumento del CES (de $^1\text{FS}^*$ a $^3\text{FS}^*$), conduciendo a un incremento del rendimiento de formación del estado $^3\text{FS}^*$, debido a la introducción de átomos de mayor masa atómica en la estructura molecular.^{49,50} Este fenómeno se evidenció al comparar el rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) para MB (Familia de las Tiazinas), que contiene un átomo de azufre, y el análogo correspondiente de la Familia de las Oxazinas que presenta un átomo de oxígeno, demostrando un valor ~ 10 veces mayor para MB.^{22,49} El “efecto del átomo pesado” también se evaluó en compuestos análogos que contienen selenio y en FS halogenados pertenecientes a la Familia de las Oxazinas.^{22,32,49} Se determinó que la fototoxicidad presentada por el compuesto *Nile Blue A* (Familia de las Oxazinas) frente a células de carcinoma y sarcoma, se incrementó de manera significativa como consecuencia de la sustitución por átomos de halógeno.⁴⁹

El compuesto *Rose Bengal* (Familia de los Xantenos) es considerado un buen productor de $^1\text{O}_2$, demostrando que los átomos de halógeno presentes en la estructura incrementan la producción de esta especie reactiva, lo que conduce a

una mejora de su eficacia fotosensibilizante con respecto a *Fluorescein*, el precursor.^{51,52}

En el **Capítulo 3: "Estudios de Agregación"**, se destacó que la formación de agregados moleculares en solución produce un cambio en el espectro de absorción y en las propiedades fotofísicas de los compuestos, modificando su emisión a una longitud de onda determinada e impactando en su capacidad fotosensibilizadora.⁵³

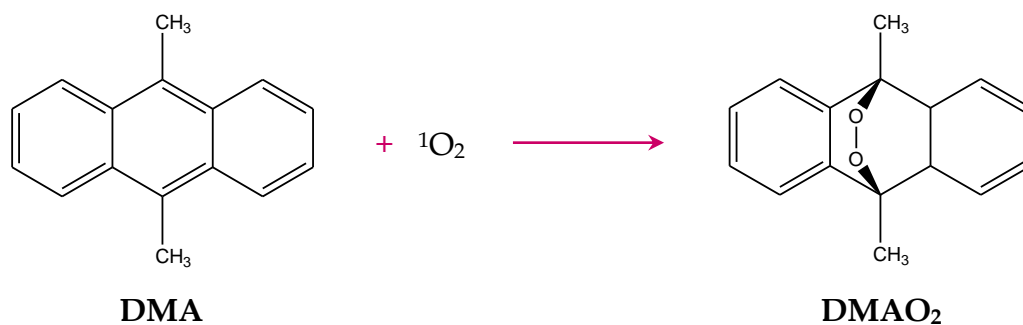
Se ha demostrado que el fenómeno de agregación impacta notablemente en las características espectrales y energéticas de los FS, derivando en una disminución de los rendimientos cuánticos y los tiempos de vida de los estados $^1\text{FS}^*$ y $^3\text{FS}^*$. Esto conduce a una reducción significativa de la producción de las especies reactivas de oxígeno y una disminución $\sim 50\%$ de la generación de $^1\text{O}_2$.^{53,54}

En consecuencia, la formación de agregados moleculares en solución desempeña un rol relevante en las aplicaciones fotodinámicas, debido a que altera significativamente las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de los FS, disminuyendo la generación de agentes citotóxicos.⁵⁵

4.1.4.4- Reacción de fotooxidación de 9,10-dimetilantraceno

El $^1\text{O}_2$ es una de las principales especies responsables de la muerte celular y la eficiencia de su generación es considerada como una medida cualitativa de la potencial fotoactividad de un FS.⁴⁹ El mismo, puede determinarse de manera indirecta mediante la reacción de fotooxidación del compuesto 9,10-dimetilantraceno (DMA), el cual reacciona selectivamente con $^1\text{O}_2$ para producir el 9,10-endoperóxido (DMAO₂), presentando esta reacción una alta constante de velocidad, tanto en agua como en diversos solventes orgánicos⁵⁶ (**Esquema 4.4**). El compuesto DMA presenta un elevado coeficiente de extinción molar a $\lambda_{\text{max}}=378$ nm, sin embargo, el producto oxidado, DMAO₂, no presenta absorción a dicha longitud de onda. En consecuencia, esto permite evaluar la producción de $^1\text{O}_2$ mediante el decaimiento de la absorción a la λ_{max} de DMA.⁵⁷

Es importante destacar que el Φ_{Δ} depende de la estructura del FS, la naturaleza del estado excitado y los solventes empleados.⁵⁸



Esquema 4.4: Reacción de 9,10-dimetilantraceno (DMA) con oxígeno singlete para generar el producto oxidado (DMAO₂).

4.2- OBJETIVOS

Considerando la importancia de las propiedades físicoquímicas y fotoquímicas de un candidato a fármaco, y en particular de un agente FS, se planteó como objetivo la evaluación de los parámetros más relevantes de los compuestos sintetizados en el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral.

La constante de ionización ácido-base es una propiedad de gran importancia biológica, ya que las membranas celulares presentan una resistencia superior al paso de moléculas ionizadas, por lo que se planteó como objetivo la determinación del pK_a de los compuestos de la Familia de las Azinas. Este parámetro, es particularmente relevante para los FS evaluados, ya que presentan valores próximos al pH fisiológico y el proceso de desprotonación está asociado con un marcado cambio en su espectro de absorción.

Otro parámetro de gran relevancia es la lipofilicidad de un fármaco, por lo que la evaluación de esta propiedad es fundamental para la optimización de su diseño, síntesis y aplicaciones biológicas. Con relación a esto, se planteó la determinación del coeficiente de partición de los nuevos derivados obtenidos, ya

que presenta un impacto fundamental en la penetración a través de membranas biológicas y en el control de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de un candidato.

Considerando que la evaluación de la estabilidad y fotoestabilidad es esencial en el desarrollo de nuevos compuestos con actividad biológica, se realizaron estudios en diversos medios y soluciones *buffer* de diferentes valores de pH, de modo de conocer el comportamiento y posible toxicidad de los compuestos pertenecientes a la Familia de las Azinas.

Finalmente, se consideró relevante la determinación del Φ_{Δ} de los compuestos involucrados en el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral, ya que entre las ERO que se generan como consecuencia de la excitación de un FS, el $^1\text{O}_2$ es considerado una de las especies que mayor daño biológico puede causar, siendo uno de los principales responsables de la muerte celular.

4.3- MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1- Materiales

Neutral Red chloride (NR, 3-amino-7-dimetilamino-2-metil fenazina hidrocloreuro; N7005-5G), *Methylene Blue chloride* (MB, 3,7-bis (dimetilamino) fenotiazina hidrocloreuro; M9140-25G) y *Cresyl Violet acetate* (CV, 9-amino-5-imino-5H-benzo[α]fenoxazina; C1791-1G) se adquirieron a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). NR y MB se emplearon sin previa purificación, confirmando una pureza > 98% por RP-HPLC. El compuesto CV se purificó empleando la metodología previamente descrita en la **Sección 2.4.2.2: "Separación de los componentes de la muestra comercial de Cresyl Violet"**. El compuesto NRBr se obtuvo mediante el procedimiento descrito en la **Sección 2.3.2.4: "Síntesis y caracterización de derivados de Azinas"** y los compuestos CVBr₃ y CRBr₃ siguiendo la metodología de la **Sección 2.3.3.5: "Síntesis y caracterización de derivados de Oxazinas y Oxazonas"**.

Las soluciones *buffer* se prepararon empleando ácido clorhídrico (37%)/cloruro de potasio (pH=1,2); ácido clorhídrico (37%)/ftalato ácido de potasio (pH=2,5 y 4,0); fosfato diácido de potasio/hidróxido de sodio (pH=5,8; 6,2; 6,7 y 7,4); ácido clorhídrico (37%)/borato de sodio (pH=9,0); hidróxido de sodio/bicarbonato de sodio (pH=11,0). La fuerza iónica de las soluciones *buffer* se ajustó a 0,5 M utilizando cloruro de sodio como electrolito soporte.

Todos los compuestos químicos empleados se obtuvieron comercialmente (Cicarelli, Sintorgan, Anedra) con la mayor pureza disponible en el mercado y las soluciones acuosas se prepararon con agua ultrapura del sistema de purificación de agua Milli-Q® (Millipore Corporation, USA). Los solventes empleados, DMF, etanol y metanol, presentaron grado analítico (Sintorgan, Anedra).

Para la determinación del coeficiente de partición se utilizaron como sustancias de referencias Fenantreno, Antraceno, *Crystal Violet*, 9-Bromofenantreno y *Rose Bengal*, adquiridas a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y Merck Millipore (Merck KGaA) con un grado de pureza apropiado.

Las fases móviles y las soluciones de lavado se prepararon empleando metanol grado HPLC (Sintorgan) y agua Milli-Q® (Millipore Corporation, USA). Se filtraron a través de una membrana de 0,45 μm y se desgasificaron previo a su uso. En los ensayos de estabilidad química y fotoestabilidad se empleó como fase móvil metanol: solución acuosa de TEAP 83 mM (70:30 v/v), en tanto que la determinación del coeficiente de partición se realizó con diferentes mezclas de metanol: solución *buffer* pH=7,4; con proporciones de metanol entre 65% v/v y 90% v/v con incrementos del 5%. La solución *buffer* pH=7,4 (10 mM) se preparó empleando fosfato monobásico de potasio (19,7% P/V) y fosfato dibásico de sodio (80,3% P/V) en agua Milli-Q®.

4.3.2- Equipamiento

Los espectros de absorción se registraron entre 200 y 700 nm empleando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. La determinación de la constante de disociación ácido-base se desarrolló en un espectrofotómetro Evolution 300, en

tanto que los ensayos de estabilidad química, fotoestabilidad y determinación de $^1\text{O}_2$ en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160.

Se empleó un sistema de HPLC Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) equipado con bomba isocrática, inyector automático, compartimiento termostatzado para columnas y detector espectrofotométrico UV-Visible de longitud de onda variable. Se utilizó una columna C18 Supelco® de fase reversa (4,6 mm x 250 mm, 5 μm) con guarda columna y una velocidad de flujo de 1,0 mL/min. La columna se termostatzó a 25 °C y el volumen de inyección se fijó en 20 μL . El sistema cromatográfico se comandó empleando el *software* Agilent ChemStation.

En los ensayos de estabilidad química y fotoestabilidad el detector espectrofotométrico UV-Visible se fijó a 280 y 540 nm, en tanto que la evaluación del coeficiente de partición se realizó a 280 nm y a la λ_{max} de los compuestos de referencia y de las sustancias de interés (NRBr, CR, CVBr₃ y CRBr₃) (Tabla 4.1).

La estabilidad química de los compuestos se evaluó empleando un baño termostático Vicking® Masson D. Los ensayos de fotoestabilidad y la determinación de oxígeno singlete se desarrollaron irradiando las muestras a una distancia de 5 cm utilizando una lámpara LED Parathom® (5w - OSRAM), que presenta un rango de emisión en la región visible del espectro electromagnético (luz blanca fría). La intensidad de irradiación medida a 5 cm de distancia con un Tes 1.332 Digital Lux Meter (TES Electrical Electronic Corp.) fue de 8,4 mW/cm². El pH de las soluciones *buffer* se determinó utilizando un pH-metro CRISON GLP 21 con electrodo de vidrio combinado.

4.3.3- Procedimientos generales

4.3.3.1- Constante de Disociación Ácido-Base

La determinación de los valores de pK_a de los compuestos en estudio, se realizó siguiendo un procedimiento adaptado del previamente descrito en literatura.¹⁶

Las curvas espectrales se registraron en diferentes soluciones *buffer* (pH 1,2 - 11,0) empleando concentraciones de 13,9 μM y 27,1 μM para NR y NRBr respectivamente. El pK_a de ambos FS se determinó a partir de la segunda derivada de la absorbancia de la especie catiónica (a la λ_{max}) en función del pH de la solución *buffer*.

Tabla 4.1: Longitud de onda (λ) y coeficiente de partición ($\log P_{O/W}$) de los compuestos considerados.

Compuestos	λ (nm)	$\log P_{O/W}$
<i>Referencias</i>		
<i>Cresyl Violet</i>	590	2,83
<i>Neutral Red</i>	540	3,20
Fenantreno	280	4,52
Antraceno	250	4,56
<i>Crystal Violet</i>	590	4,95
9-Bromo-fenantreno	280	5,45
<i>Rose Bengal</i>	550	6,58
<i>Compuestos de interés</i>		
NRBr	540	---
CVBr ₃	590	---
CR	510	---
CRBr ₃	510	---

Las soluciones de los compuestos en estudio se prepararon en el momento de realizar las determinaciones. Todos los experimentos se desarrollaron a temperatura ambiente y por duplicado, obteniendo resultados consistentes.

4.3.3.2- Coeficiente de Partición

4.3.3.2.1- Determinación de $\log P_{HPLC}$

La metodología desarrollada empleando RP-HPLC permitió determinar el tiempo de retención de los diversos compuestos en condiciones isocráticas, utilizando fases móviles con diferentes proporciones de metanol como modificador orgánico (φ). Éste solvente es un fuerte donador y aceptor de enlaces hidrógeno, por lo que su adición a una fase acuosa, sólo produce un efecto moderado sobre el ordenamiento de las moléculas de agua, debido a la similitud fisicoquímica entre ambos. Por este motivo, es considerado un óptimo modificador orgánico, siendo el más empleado para la determinación cromatográfica de la lipofilia.^{20,28}

Como sustancias de referencia se emplearon siete compuestos estructuralmente relacionados a los nuevos derivados, a fin de establecer la correlación entre los valores de los coeficientes de partición ($\log P_{O/W}$) y el $\log k_w$ experimental. Los datos de $\log P_{O/W}$ de literatura cubren un amplio intervalo de lipofilia (2,83 a 6,58)^{33,34,59} (**Tabla 4.1**).

Tanto las sustancias de referencia como los compuestos de interés (NRBr, CR, CVBr₃ y CRBr₃) se inyectaron por triplicado. El factor de capacidad (k') de todos los compuestos se determinó a partir de los datos de retención obtenidos experimentalmente, aplicando la **Ecuación 4.1**, donde t_R es el tiempo de retención del compuesto y t_0 es el tiempo muerto, el cual se define como el tiempo de retención de un compuesto no retenido y se determinó mediante la inyección de metanol.^{20,25}

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad \text{(Ecuación 4.1)}$$

Los valores de $\log k'$ de los compuestos de referencia y de los nuevos derivados se representaron gráficamente en función del porcentaje de metanol (φ) en la fase móvil, según la relación lineal establecida en la **Ecuación 4.2**, donde S es la pendiente.

$$\log k' = S \varphi + \log k_w \quad (\text{Ecuación 4.2})$$

La extrapolación de los valores de $\log k'$ correspondientes al 100% de solución acuosa (0% modificador orgánico) obtenidos para cada compuesto, permitieron determinar $\log k_w$. En este caso, k' es independiente del efecto del modificador orgánico y las particiones polares-apolares son similares a las determinadas aplicando la metodología de la ampolla.⁶⁰ Los valores de $\log k_w$ son considerados como una medida de la partición de los analitos entre una fase móvil constituida por una solución *buffer* pH=7,4 y una fase estacionaria no polar, lo que permite la comparación del carácter lipofílico de todos los compuestos.^{20,25}

La representación gráfica de $\log k_w$ en función de $\log P_{O/W}$ para los compuestos de referencia (**Ecuación 4.3**), permitió determinar los coeficientes a y b .

$$\log P_{O/W} = a \log k_w - b \quad (\text{Ecuación 4.3})$$

El valor de $\log k_w$ de los nuevos derivados se aplicó a la **Ecuación 4.4** a fin de determinar el coeficiente de partición ($\log P_{\text{HPLC}}$).

$$\log P_{\text{HPLC}} = a \log k_w - b \quad (\text{Ecuación 4.4})$$

Los análisis de regresiones lineales y correlaciones se desarrollaron empleando el programa OriginPro 8 SR0 (OriginLab Corporation).

4.3.3.2.2- Cálculo teórico de $\log P$

Los valores teóricos de los coeficientes de partición se determinaron mediante el empleo de diferentes programas que permiten desarrollar cálculos de diversos descriptores de lipofilidad, sobre la base de la geometría molecular obtenida.¹⁷ Los coeficientes de partición teóricos ($\log P$) de todos los compuestos examinados se calcularon utilizando diferentes *software* comercialmente disponibles y programas de libre acceso, los cuales emplean aproximaciones por

contribución de los distintos fragmentos moleculares (Tabla 4.2). Estos programas realizan la fragmentación de la molécula proporcionando valores de lipofilidad a cada fragmento molecular, siendo el clog P , la sumatoria de éstos valores, considerando factores de corrección por efectos electrónicos y estéricos al contemplar la estructura molecular en su totalidad. Los programas que emplean el método de estimación por fragmentos han demostrado las mejores correlaciones con los valores determinados experimentalmente.⁶¹

Tabla 4.2: Clasificación de los diversos *software* empleados para la predicción de clog P .

Software químicos disponibles comercialmente	
ACD/logP Versión 6.0	Toronto, Canadá.
ChemDraw Ultra Versión 9.0 (ClogP)	CambridgeSoft, Cambridge, Massachusetts, USA.
Bio-Loom Versión 1.5 para <i>Windows</i>	BioByte Corp., Claremont, USA.
Programas de libre acceso	
Molinspiration Cheminformatics Software; miLogP 2.2	http://www.molinspiration.com/
OSIRIS Property Explorer	http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/

La correlación entre los datos experimentales ($\log k_w$) y los valores de lipofilidad calculados por los diversos programas empleados (clog P) se estableció, mediante un análisis de relación lineal (Ecuación 4.5), determinando los parámetros y datos estadísticos.

$$\text{clog P} = a \log k_w + b \quad (\text{Ecuación 4.5})$$

4.3.3.3- Estabilidad Química y Fotoestabilidad

La evaluación de la estabilidad química de los compuestos se desarrolló en agua y etanol a 25°C y en soluciones *buffer* pH=1,2; 5,8 y 7,4 a 37°C, protegiendo las muestras de la luz. Se empleó una concentración $\sim 10^{-5}$ M y se retiraron muestras a intervalos de 1 hora durante 32 horas. Los ensayos de fotoestabilidad de los compuestos ($\sim 10^{-5}$ M) en solución *buffer* pH=7,4 se desarrollaron a temperatura ambiente en celdas de cuarzo. Las muestras se irradiaron durante 120 minutos, recibiendo una dosis total de luz de 60,5 J/cm² (Figura 4.1).

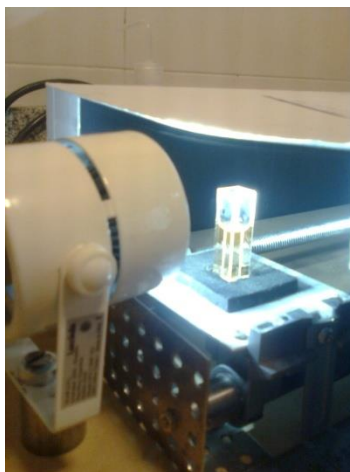


Figura 4.1: Diseño experimental del ensayo de fotoestabilidad y determinación de oxígeno singlete.

Las soluciones se prepararon en el momento de iniciar los estudios de estabilidad química y fotoestabilidad. Los ensayos se desarrollaron por duplicado obteniendo resultados consistentes. Todas las muestras se evaluaron por espectrofotometría UV-Visible, realizando la validación del método analítico mediante la determinación de parámetros tales como selectividad, linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y límite de cuantificación. Además, la ausencia de productos de degradación se corroboró mediante RP-HPLC.

4.3.3.4- Oxígeno Singlete

El ϕ_{Δ} se determinó mediante la reacción de fotooxidación de DMA empleando DMF como solvente, en tanto que, experimentos adicionales con CV y CR que permitieron corroborar los resultados obtenidos se desarrollaron en metanol. Las soluciones de los compuestos FS individuales se prepararon en el momento de realizar los experimentos y se irradiaron directamente en una celda de cuarzo, en presencia de una concentración de DMA $\sim 40 \mu\text{M}$ ($\text{Abs} \sim 0,6$ a $\lambda_{\text{max}} = 378 \text{ nm}$).

Con la finalidad de asegurar que la cantidad de fotones absorbidos por unidad de tiempo sea la misma en todos los experimentos, la absorbancia a la λ_{max} para cada FS se ajustó a $\sim 0,18$.^{62,63} Considerando que los compuestos presentan diferentes coeficientes de extinción, se requirió una solución de concentración $\sim 10 \mu\text{M}$ para los compuestos pertenecientes a la Familia de Azinas y Oxazinas, en tanto que para CR y CRBr₃ soluciones $\sim 35 \mu\text{M}$ y $\sim 80 \mu\text{M}$, respectivamente.

La cinética de fotooxidación de DMA se evaluó determinando la disminución de la absorbancia a $\lambda_{\text{max}} = 378 \text{ nm}$ como una función del tiempo de irradiación. Las constantes de velocidad observadas (k_{obs}) se obtuvieron mediante un ajuste lineal a partir de la representación gráfica de $\text{Ln}(\text{Abs}_0/\text{Abs}_t)$ en función del tiempo de irradiación. Los valores obtenidos de k_{obs} se normalizaron considerando el registro de absorbancia de cada FS al inicio del ensayo ($t=0$) y la longitud de onda de máxima absorción (λ_{max} en DMF: MB= 665 nm; NR= 450 nm; NRBr= 450 nm; CV= 482 nm; CVBr₃= 474 nm; CR= 514 nm; CRBr₃= 502 nm; λ_{max} en metanol: MB=653 nm; CV= 593 nm; CR= 517 nm).

A partir de los valores obtenidos de k_{obs} , se calculó el ϕ_{Δ} para cada uno de los compuestos evaluados, aplicando la **Ecuación 4.6**. Todas las determinaciones se referenciaron al compuesto MB (considerando $\phi_{\Delta} = 1$), debido a la similitud estructural con los FS de interés y considerando que es un buen productor de $^1\text{O}_2$.

$$\phi_{\Delta}^{\text{FS}} = \frac{\phi_{\Delta}^{\text{ref}} k_{\text{obs}}^{\text{FS}} \text{Abs}^{\text{ref}}}{k_{\text{obs}}^{\text{ref}} \text{Abs}^{\text{FS}}} \quad \text{(Ecuación 4.6)}$$

ref=compuesto de referencia (MB); **FS**= fotosensibilizador de interés; **Abs**= absorbancia a $t=0$.

La evaluación de los compuestos se desarrolló irradiando las soluciones de los FS por un período de 360 segundos, recibiendo una dosis total de luz de 3,024 J/cm² (Figura 4.1). La determinación de la absorbancia se realizó cada 30 segundos, aplicando el método unipuntual mediante Espectrofotometría UV-Visible.

Soluciones de los FS en ausencia de DMA, como así también una solución de DMA en ausencia de moléculas FS, se irradiaron en DMF y metanol siguiendo el mismo procedimiento aplicado para la determinación de ¹O₂. Estas experiencias permitieron demostrar que todos los compuestos evaluados fueron estables en ambos solventes durante el tiempo de ensayo.

4.4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1- Constante de Disociación Ácido-Base

Para la determinación experimental del pK_a se registraron las curvas espectrales de ambos compuestos pertenecientes a la Familia de las Azinas, en soluciones *buffer* de un amplio intervalo de pH (Figura 4.2).

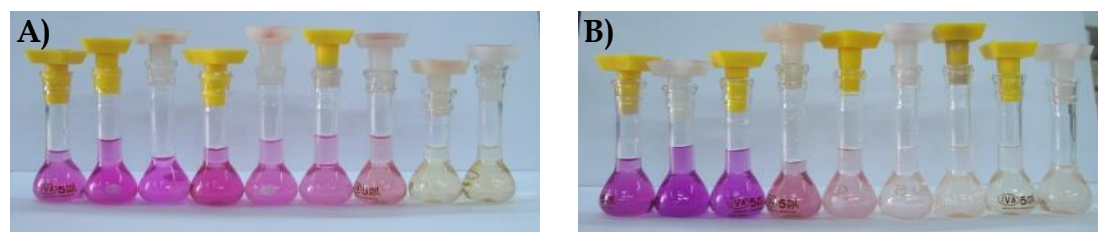


Figura 4.2: Fotografías de las soluciones de ambos FS en *buffer* de diferente pH. De izquierda a derecha: *buffer* pH=1,2; 2,5; 4,0; 5,8; 6,2; 6,7; 7,4; 9,0 y 11,0. **A)** NR; **B)** NRBr.

La representación gráfica de la absorbancia de los FS en función del pH del medio, se observa en la **Figura 4.3.A** para el compuesto NR y en la **Figura 4.3.B** para el nuevo derivado monobromado. Del análisis de la **Figura 4.3.A** se desprende que el precursor NR en soluciones *buffer* de pH ácido, presentó una curva espectral atribuida a la especie catiónica, cuyo máximo de absorción se evidencia a ~ 535 nm.

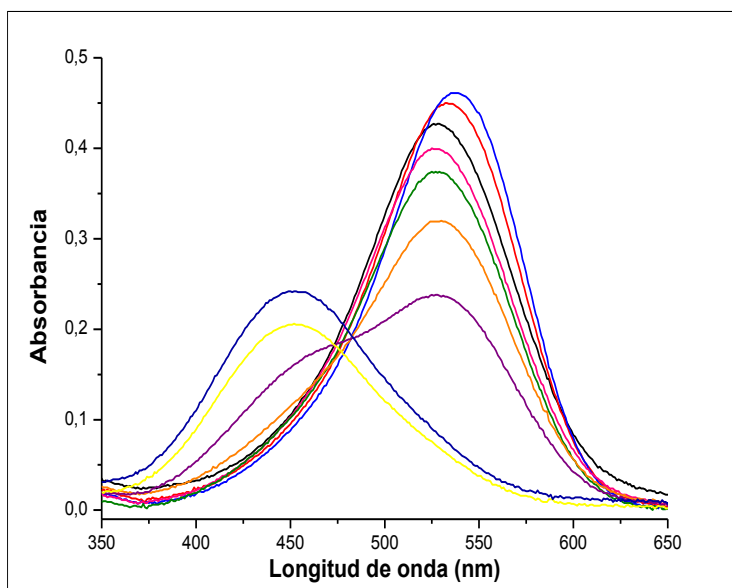


Figura 4.3.A: Espectros de absorción de NR ($13,9 \mu\text{M}$) en función del pH de la solución *buffer*. (—) pH=1,2; (—) pH=2,5; (—) pH=4,0; (—) pH=5,8; (—) pH=6,2; (—) pH=6,7; (—) pH=7,4; (—) pH=9,0; (—) pH=11,0.

El incremento del pH del medio condujo a la desprotonación del compuesto, originando la forma neutra del mismo, que presentó una curva espectral caracterizada por un máximo de absorción a ~ 450 nm. Las soluciones del compuesto precursor, continúan siendo coloreadas a altos valores de pH, presentando un color amarillo. Por su parte, en *buffer* de pH fisiológico (pH=7,4) ambas especies están presentes en solución, lo que se evidencia claramente a partir de las dos bandas de absorción de la curva espectral. Estudios

desarrollados en condiciones experimentales comparables, han sido reportados en literatura.^{10,14,15}

Los espectros de absorción de NRBr (**Figura 4.3.B**) son fuertemente dependientes del pH del medio, observando soluciones intensamente coloreadas a pH=1,2; 2,5 y 4,0; y una banda espectral a ~530 nm, atribuida a la forma catiónica del compuesto. Las soluciones de este FS en *buffer* pH $\geq 7,4$ son incoloras, ya que la abstracción del protón de la forma catiónica, genera la especie aromática no iónica, debido a que el átomo de nitrógeno central del heterociclo es deficiente en electrones⁶⁴ (**Sección 4.4.3.1- "Estudios de Estabilidad Química"**).

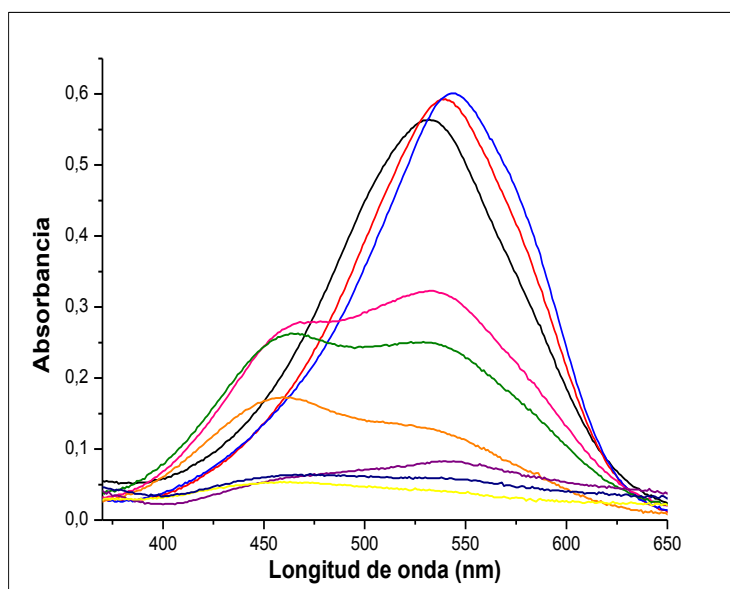


Figura 4.3.B: Espectros de absorción de NRBr (27,1 μM) en función del pH de la solución *buffer*. (—) pH=1,2; (—) pH=2,5; (—) pH=4,0; (—) pH=5,8; (—) pH=6,2; (—) pH=6,7; (—) pH=7,4; (—) pH=9,0; (—) pH=11,0.

Las curvas espectrales del nuevo derivado monobromado en *buffer* pH=5,8; 6,2 y 6,7 presentan dos bandas de absorción, a 530 nm y a ~ 470 nm. Ésta última banda, no corresponde a la especie neutra de este compuesto, ya que la misma no se encuentra presente en soluciones de pH $> 6,7$. Las soluciones del nuevo derivado NRBr se tornan incoloras en medios de pH más elevado que su pK_a. La banda de

absorción del nuevo compuesto bromado presente a ~ 470 nm, se atribuyó a agregados de orden superior al evaluar las curvas espectrales del FS en función de la concentración (**Sección 3.4.1.3: "Evaluación de la agregación en soluciones buffer"**).

Una observación interesante se realizó al adicionar 250 μ L de una solución de ácido clorhídrico 0,1 M a una solución de NR de pH = 9 (color amarillo) y de NRBr (solución incolora), evidenciando un viraje de color a fucsia y violeta, respectivamente. Esta experiencia indicó que el medio ácido desestabiliza las formas neutras y regenera las especies iónicas, lo que sugiere interacciones débiles y reversibles.⁶⁴ Además, las especies iónicas de ambos FS, nuevamente dan origen a las correspondientes formas no iónicas en solución alcalina.

La determinación del pK_a de ambos FS, se realizó a partir de la representación gráfica de la segunda derivada de la Abs de la especie catiónica en función del pH del medio (**Figura 4.4.A**, compuesto NR; **Figura 4.4.B**, derivado monobromado). De este modo, se determinó para el nuevo compuesto NRBr un pK_a=5,8 \pm 0,1; y para NR un valor de pK_a=7,0 \pm 0,8; siendo éste comparable a los reportados previamente en literatura.¹⁰⁻¹⁴

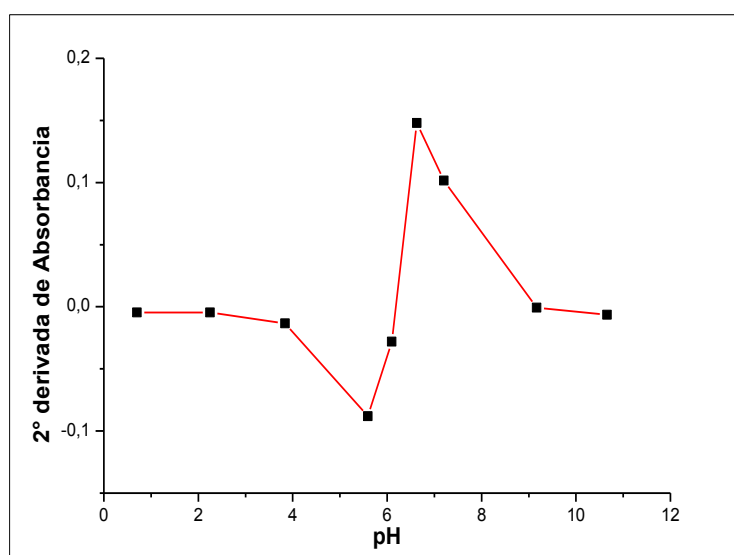


Figura 4.4.A: Representación gráfica de la segunda derivada de la absorbancia de NR determinada a la longitud de onda máxima de la especie catiónica (~ 535 nm) en función del pH.

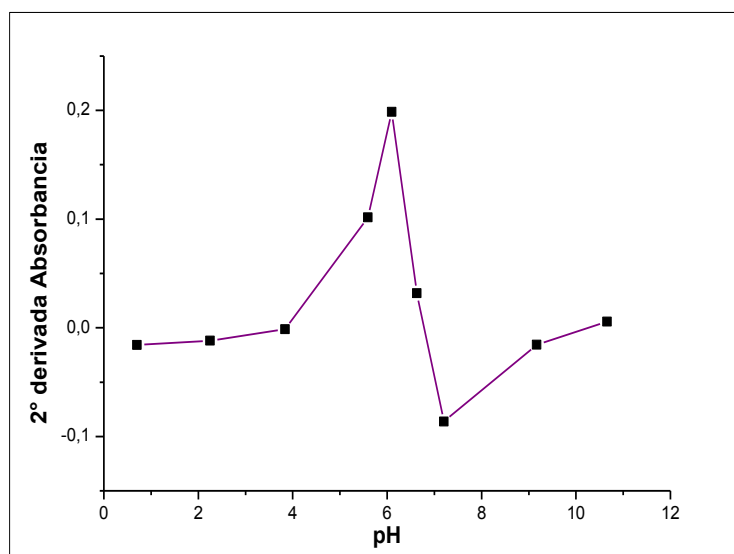


Figura 4.4.B: Representación gráfica de la segunda derivada de la absorbancia de NRBr determinada a la longitud de onda máxima de la especie catiónica (~ 530 nm) en función del pH.

La disminución del pK_a del compuesto bromado en comparación con el precursor NR, es consecuencia del carácter aceptor de electrones del átomo de halógeno, comportamiento que se corresponde con antecedentes bibliográficos.⁴⁹ Esta característica se puede observar en la **Figura 4.5** donde se evidencia la representación gráfica de la absorbancia de NR y NRBr en función del pH.

Los resultados obtenidos indican que el nuevo FS bromado en condiciones fisiológicas, estaría presente como una mezcla de la forma neutra y catiónica, presentando una mayor proporción de la especie neutra al compararlo con el compuesto precursor NR. Esto permitiría que la forma no ionizada del derivado bromado atravesase fácilmente las diversas membranas biológicas, posibilitando la incorporación y acumulación en el interior celular. Posteriormente, el menor pH intracelular conduciría nuevamente a la protonación del derivado monobromado.^{49,65}

Un estudio reportado en literatura, desarrollado con nuevos derivados halogenados de *Nile Blue A* (Familia de las Oxazinas) determinó la influencia del pH del medio en la absorción óptima y la fototoxicidad de los compuestos FS.

Las especies neutras de estos derivados, estructuralmente similares a los evaluados en esta Tesis Doctoral, difundieron fácilmente a través de la membrana y debido al bajo pH intracelular, permanecen en el interior bajo sus formas protonadas.⁴⁹

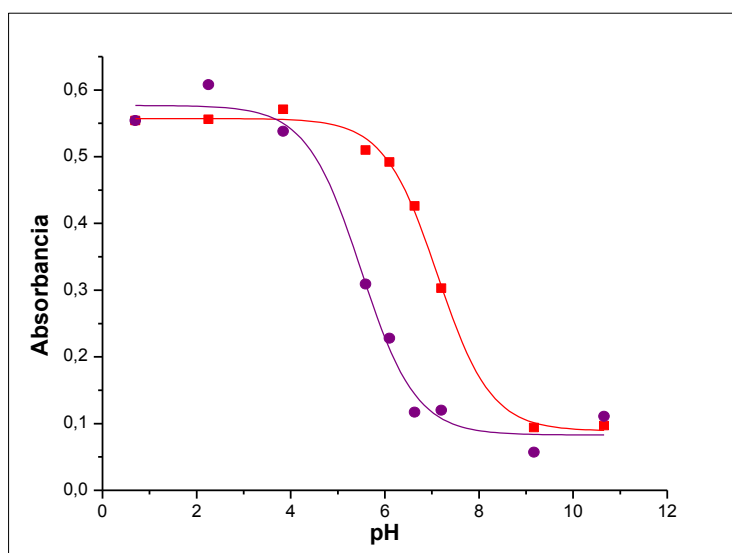


Figura 4.5: Representación gráfica de la absorbancia determinada al máximo de la especie catiónica en función del pH. (■) NR; (●) NRBr.

4.4.2- Coeficiente de Partición

4.4.2.1- Determinación de $\log P_{HPLC}$

Se desarrolló la optimización de la composición de la fase móvil para los análisis cromatográficos, seleccionando la combinación metanol: solución *buffer* pH=7,4. La evaluación experimental de la lipofilidad de todos los compuestos, se realizó aplicando la **Ecuación 4.1**, determinando el factor de capacidad, k' . La correlación entre los valores de $\log k'$ y la composición de la fase móvil (φ entre 65% v/v y 90% v/v; **Ecuación 4.2**) evidenció una relación lineal para los compuestos de referencia (**Figura 4.6**) como así también, para los derivados de interés (**Figura 4.7**).

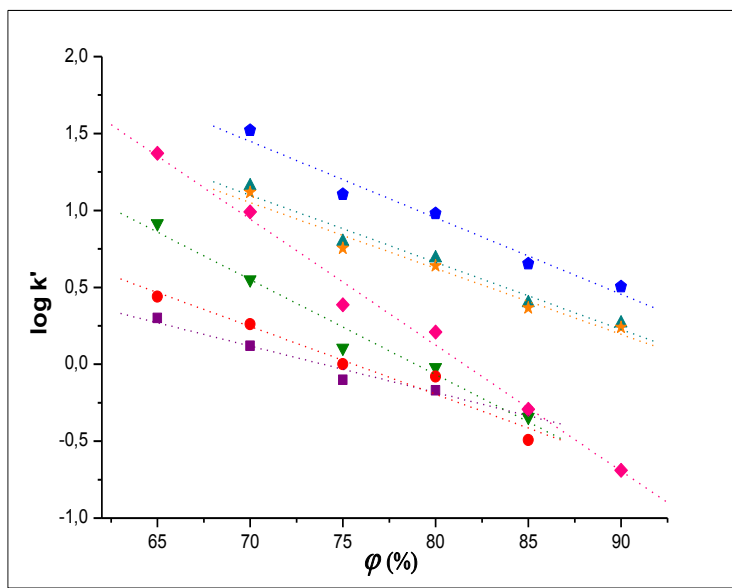


Figura 4.6: Logaritmo del factor de capacidad ($\log k'$) en función del porcentaje de modificador orgánico (ϕ) para los compuestos de referencia. (■) *Cresyl Violet*; (●) *Neutral Red*; (★) *Fenantreno*; (▲) *Antraceno*; (▼) *Crystal Violet*; (◆) *9-bromofenantreno*; (◆) *Rose Bengal*.

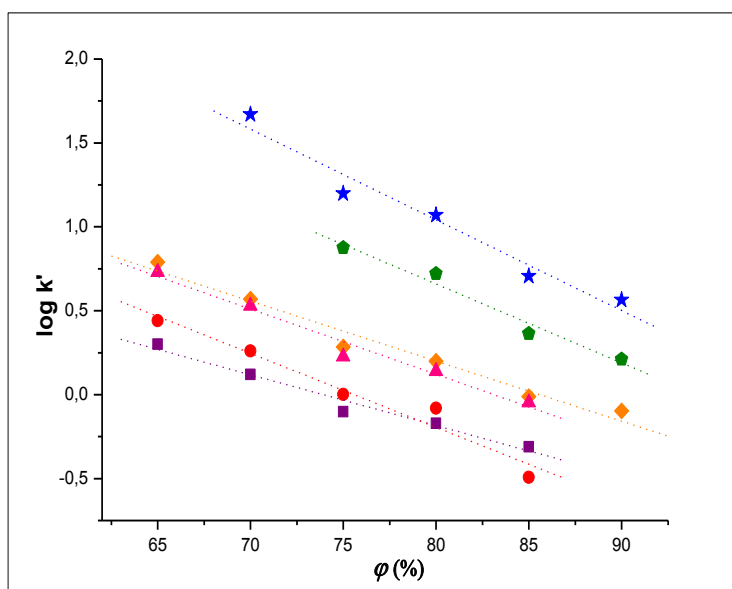


Figura 4.7: Logaritmo del factor de capacidad ($\log k'$) en función del porcentaje de modificador orgánico (ϕ) para los compuestos de interés. (■) *Cresyl Violet*; (●) *Neutral Red*; (◆) *Cresyl Red*; (▲) *Neutral Red monobromado*; (◆) *Cresyl Violet tribromado*; (★) *Cresyl Red tribromado*.

La pendiente S , obtenida de la **Ecuación 4.2**, es negativa para todos los compuestos ensayados, lo que está relacionado con la estructura hidrófoba de las moléculas, que interactúa con la fase estacionaria no polar²⁰ (**Tabla 4.3**).

A partir de las correlaciones establecidas, se determinó el valor de $\log k_w$ para todos los compuestos evaluados. Éstos resultados se presentan en la **Tabla 4.3**.

Tabla 4.3: Parámetros lipofílicos y valores de $\log P_{\text{HPLC}}$.

Compuestos	φ	S	$\log k_w^*$	r^2	$\log P_{\text{HPLC}}$
<i>Referencias</i>					
<i>Cresyl Violet</i>	65-85	-0,031±0,002	2,3±0,1	0,987	2,9±0,1
<i>Neutral Red</i>	65-85	-0,033±0,002	2,6±0,1	0,991	3,2±0,1
Fenantreno	70-90	-0,044±0,005	4,2±0,4	0,956	4,5±0,4
Antraceno	70-90	-0,046±0,003	4,4±0,2	0,986	4,7±0,2
<i>Crystal Violet</i>	65-85	-0,060±0,005	4,8±0,2	0,974	5,0±0,2
9-Bromo-fenantreno	70-90	-0,052±0,004	5,1±0,3	0,979	5,3±0,3
<i>Rose Bengal</i>	65-90	-0,083±0,003	6,8±0,2	0,994	6,7±0,3
<i>Compuestos de interés</i>					
NRBr	65-85	-0,039±0,002	3,3±0,1	0,993	3,8±0,1
CVBr ₃	75-90	-0,0445±0,0009	4,21±0,07	0,999	4,5±0,1
CR	65-90	-0,038±0,002	3,2±0,1	0,991	3,7±0,1
CRBr ₃	70-90	-0,053±0,005	5,3±0,4	0,968	5,5±0,4

*Los tiempos de retención se determinaron por triplicado.

Los valores de $\log k_w$ permitieron establecer una correlación entre los datos obtenidos experimentalmente y los valores de $\log P_{\text{O/W}}$ para los compuestos de referencia (**Tabla 4.1**, **Ecuación 4.3**). La **Figura 4.8** evidencia la representación gráfica de la **Ecuación 4.7**, con un excelente ajuste.

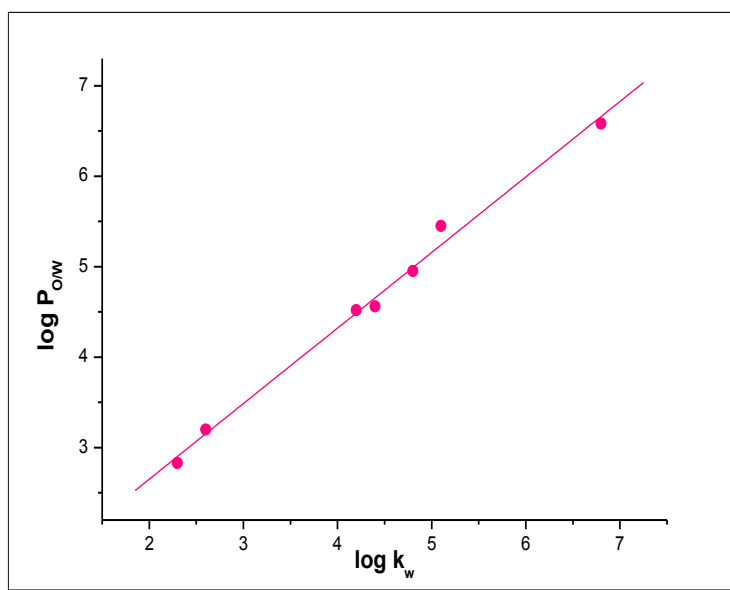


Figura 4.8: Representación gráfica de $\log P_{O/W}$ versus $\log k_w$ para los compuestos de referencia.

$$\log P_{O/W} = (0,84 \pm 0,03) \log k_w + (1,0 \pm 0,1) \quad (\text{Ecuación 4.7})$$

$$n=7; r=0,996; r^2= 0,992; s=9,865; F=704,351$$

s: suma de cuadrados residual; F: valor de la prueba de significancia de Fisher.

Se determinaron los valores de $\log P_{HPLC}$ de acuerdo con la **Ecuación 4.8**. Los datos obtenidos se presentan en la **Tabla 4.3**.

$$\log P_{HPLC} = (0,84 \pm 0,03) \log k_w + (1,0 \pm 0,1) \quad (\text{Ecuación 4.8})$$

El análisis de los resultados obtenidos evidenció un incremento significativo de la lipofilidad debido a la incorporación de átomos de bromo en la estructura molecular. Es importante destacar, que se observó la misma tendencia en compuestos relacionados estructuralmente, pertenecientes a las Familias de las

Tiazinas y Oxazinas, al determinar un incremento de los valores de lipofilidad para los nuevos derivados halogenados con respecto a los reactivos de partida.^{32,65,66}

Es ampliamente conocido que la lipofilidad de una molécula impacta en numerosos procesos relativos a la actividad que presenta, estando estrechamente relacionado con las características de permeabilidad y solubilidad.²⁸ En este contexto, las características lipofílicas de un candidato a fármaco se presentan como el parámetro fisicoquímico más importante en los estudios de relación estructura-actividad y su determinación es un requisito fundamental durante las primeras etapas de los procesos de desarrollo de fármacos.^{18,28}

Se ha evidenciado que el valor de $\log P_{O/W}$ de FS pertenecientes a la Familia de las Tiazinas determina la localización subcelular del compuesto, y por lo tanto, el sitio donde ocurrirá el daño fotooxidativo, impactando directamente en los procesos apoptóticos.⁶⁷ Además, se ha demostrado que un incremento de la lipofilidad conduce a una mayor captación celular, lo que usualmente se correlaciona con un aumento de la actividad biológica.²³ Es por esto, que el incremento de los valores de lipofilidad de los nuevos derivados FS bromados, es una característica relevante y se evidencia como una propiedad ventajosa, destacando el impacto que podría presentar en la actividad biológica de los nuevos compuestos bromados.

4.4.2.2- Cálculo teórico de log P

Los valores de $\log P$ de los nuevos derivados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral y de las sustancias utilizadas como referencia se determinaron aplicando diversos programas (**Tabla 4.2**). Las correlaciones entre los valores experimentales de $\log k_w$ y los parámetros de lipofilidad estimados computacionalmente (**Ecuación 4.5**), evidenciaron un buen ajuste lineal para el conjunto de compuestos ensayados. En la **Tabla 4.4** se presentan los parámetros y datos estadísticos de las correlaciones obtenidas entre el $\log k_w$ y los valores de $\log P$ proporcionados por todos los programas empleados.

Tabla 4.4: Correlación entre los valores experimentales de $\log k_w$ y clog P determinados por diversos *software* químicos.

Programa	<i>a</i>	<i>b</i>	r^2	<i>s</i>	F
OSIRIS	1,6±0,2	-2,1±0,8	0,913	2,925	74,053
miLogP	1,4±0,2	-1,4±0,8	0,892	3,164	58,775
ACD/logP	1,8±0,3	-2±1	0,870	5,681	47,887
ChemDraw	1,5±0,2	-1±1	0,835	5,297	36,502
Bio-Loom	1,5±0,2	-1±1	0,834	5,437	36,209

a y *b*: coeficientes de la **Ecuación 4.5**; r^2 : coeficiente de correlación; *s*: suma de cuadrados residual; F: valor de la prueba de significancia de Fisher.

El empleo del programa OSIRIS permitió obtener la correlación más alta con los datos experimentales, presentando un coeficiente de correlación, $r^2=0,913$ (**Figura 4.9**). Los demás programas utilizados evidenciaron valores entre 0,892 y 0,834, lo que reveló una buena correlación para los compuestos ensayados, de acuerdo con los criterios aceptados en literatura.⁶¹

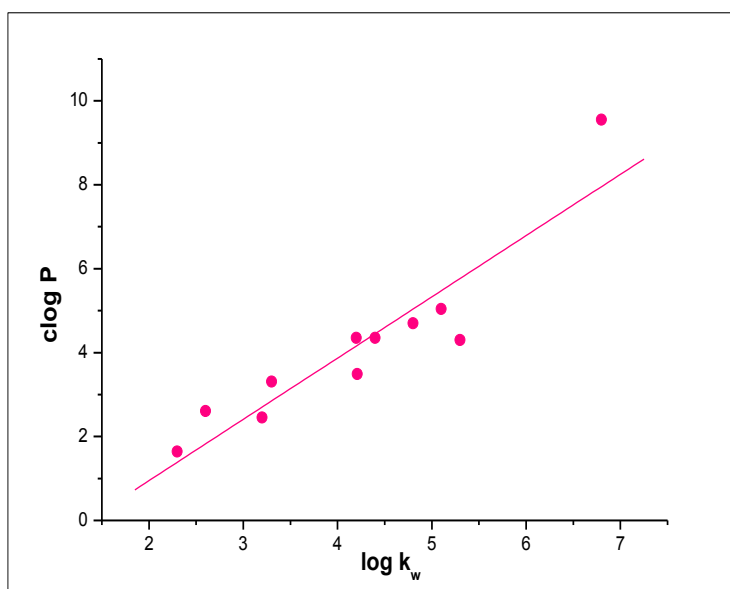


Figura 4.9: Correlación entre los valores experimentales de $\log k_w$ y los calculados (clog P) aplicando el programa OSIRIS.

4.4.3- Estabilidad Química y Fotoquímica

4.4.3.1- Estudios de Estabilidad Química

Se realizó la validación de la metodología desarrollada mediante UV-Visible, presentando los valores obtenidos para NR y el nuevo derivado monobromado en la **Tabla 4.5.A** y **Tabla 4.5.B**, respectivamente.

La estabilidad de NR y NRBr se evaluó en etanol a temperatura ambiente, simulando condiciones de uso frecuente en el laboratorio. Los resultados obtenidos se observan en la **Figura 4.10**, evidenciando que ambos FS presentaron alta estabilidad química en este solvente durante el período evaluado.

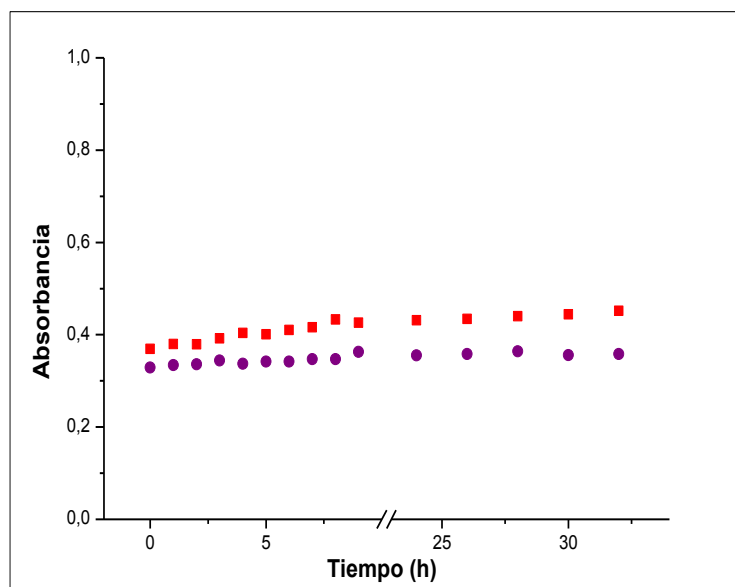


Figura 4.10: Estudio de estabilidad en etanol. (■) NR ($\lambda=460$ nm) y (●) NRBr ($\lambda=450$ nm).

También se evaluaron ambos FS en soluciones *buffer* de pH fisiológicos (pH=1,2; 5,8 y 7,4) a 37 °C durante 32 horas. Al analizar el reactivo de partida se destaca que la determinación en solución *buffer* pH=7,4 se realizó a la longitud de onda máxima de la especie catiónica (510 nm) y de la especie neutra (470 nm) (**Figura 4.11.A**).

Tabla 4.5.A: Validación del método analítico empleando espectrofotometría UV-Visible aplicable a estudios de estabilidad de *Neutral Red* en diversos medios.

Medio	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Exactitud		Precisión			Rango ($\mu\text{g/mL}$)	LD ($\mu\text{g/mL}$)	LC ($\mu\text{g/mL}$)
		n=3	n=9	SD	n=3	n=3			
Etanol	460	99,2		0,51		0,52			
		100	100	0,52	0,82	0,52	3-6	0,20	0,60
		100		0,52		0,52			
Agua	535	98,4		0,46		0,46			
		100	99,6	0,13	1,1	0,13	1-5	0,050	0,15
		99,7		0,10		0,10			
<i>Buffer</i> pH=1,2	529	100		2,0		2,0			
		100	99,5	0,10	1,4	0,10	2-24	0,19	0,59
		98,1		0,17		0,17			
<i>Buffer</i> pH=5,8	525	96,0		0,36		0,38			
		102	98,8	0,37	3,1	0,36	7-22	0,97	2,9
		97,6		0,95		0,97			
<i>Buffer</i> pH=7,4	510	100		0,98		0,98			
		102	99,9	1,3	1,8	0,13	4-22	0,37	1,1
		98,2		1,0		1,0			
<i>Buffer</i> pH=7,4	470	98,0		1,7		1,7			
		101	99,1	1,3	1,8	1,3	4-22	0,35	1,1
		98,5		1,1		1,1			

SD: Desviación estándar; RSD: Desviación estándar relativa; LD: Límite de detección; LC: Límite de cuantificación. *Buffer* pH=7,4; $\lambda=510$ nm: Determinación de la especie catiónica; $\lambda=470$ nm: Determinación de la forma neutra.

Tabla 4.5.B: Validación del método analítico empleando espectrofotometría UV-Visible aplicable a estudios de estabilidad de *Neutral Red* monobromado en diversos medios.

Medio	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Exactitud		Precisión			Rango ($\mu\text{g/mL}$)	LD ($\mu\text{g/mL}$)	LC ($\mu\text{g/mL}$)
		n=3	n=9	SD	n=3	n=9			
Etanol	450	99,4	99,6	0,67	0,67	0,76	8 - 20	0,67	2,0
		100		0,10	0,10				
		99,0		0,22	0,22				
Agua	543	98,8	99,2	3,3	3,3	2,3	4 - 24	0,37	1,1
		100		2,7	2,7				
		98,8		1,1	1,1				
<i>Buffer</i> pH=1,2	534	104	101	0,58	0,56	2,1	8 - 25	0,73	2,2
		100		0,42	0,42				
		99,4		0,40	0,41				
<i>Buffer</i> pH=5,8	534	99,8	98,7	3,0	3,0	4,2	10 - 20	2,1	6,3
		98,6		6,5	6,6				
		97,7		3,7	3,7				
<i>Buffer</i> pH=7,4	463	103	101	3,1	3,0	3,8	10 - 30	1,2	3,6
		101		5,3	5,2				
		99,0		3,4	3,4				
<i>Buffer</i> pH=7,4	510	101	99,5	1,0	1,0	1,8	12 - 35	1,3	3,8
		99,2		3,0	3,1				
		98,6		0,25	0,26				

SD: Desviación estándar; RSD: Desviación estándar relativa; LD: Límite de detección; LC: Límite de cuantificación. *Buffer* pH=5,8; $\lambda=534$ nm: Determinación de la especie agregada; $\lambda=463$ nm: Determinación de agregados mayores.

Por su parte, la determinación del nuevo derivado NRBr en solución *buffer* pH=5,8 se realizó a la longitud de onda máxima de la especie neutra y la forma catiónica a 463 nm y 534 nm, respectivamente (**Figura 4.11.B**).

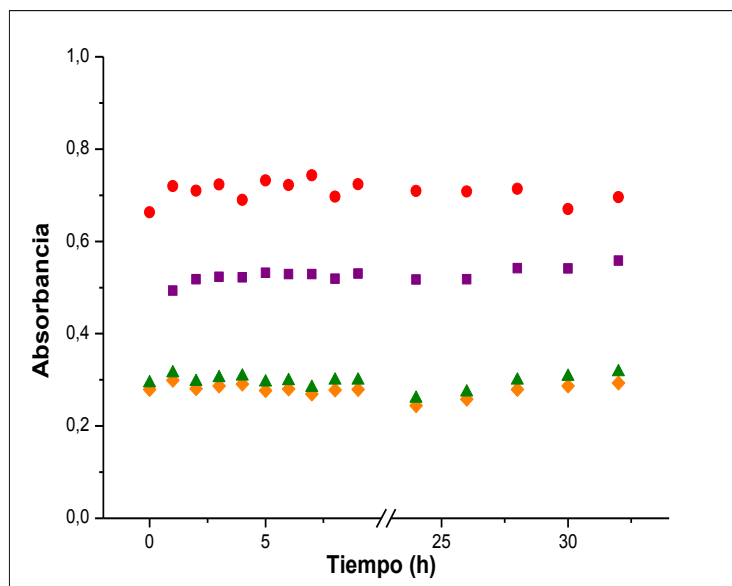


Figura 4.11.A: Estudio de estabilidad de NR en soluciones *buffer* de diferente pH. (■) *buffer* pH=1,2 ($\lambda=529$ nm); (●) *buffer* pH=5,8 ($\lambda=525$ nm); (▲) *buffer* pH=7,4 ($\lambda=470$ nm) y (◆) *buffer* pH=7,4 ($\lambda=510$ nm).

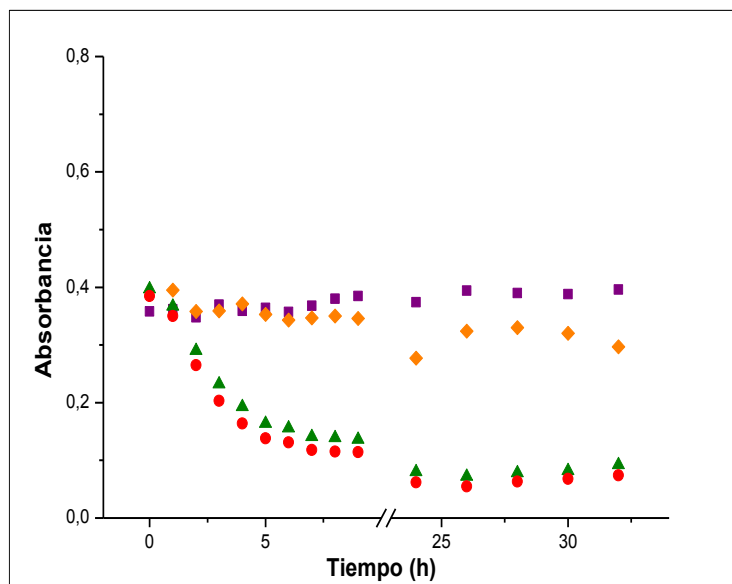


Figura 4.11.B: Estudio de estabilidad de NRBr en soluciones *buffer* de diferente pH. (■) *buffer* pH=1,2 ($\lambda=534$ nm); (●) *buffer* pH=5,8 ($\lambda=463$ nm); (▲) *buffer* pH=5,8 ($\lambda=534$ nm) y (◆) *buffer* pH=7,4 ($\lambda=510$ nm).

Como se puede observar en la **Figura 4.11.A**, el precursor NR demostró alta estabilidad química en todos los medios ensayados por 32 horas.

El análisis del derivado monobromado (**Figura 4.11.B**) en solución *buffer* pH=7,4 se desarrolló con la finalidad de conocer la estabilidad de la especie neutra (predominante a ese pH), sin embargo, considerando que la misma es incolora se adicionaron 250 μ L de ácido clorhídrico 0,1 M, de modo de regenerar la especie catiónica coloreada y posibilitar la determinación por espectrofotometría UV-Visible.

El nuevo FS bromado en solución *buffer* pH=5,8 se decoloró gradualmente en función del tiempo. Éste efecto se revirtió casi completamente por la adición de ácido clorhídrico, lo que indica un equilibrio entre la forma catiónica y la especie no iónica (**Sección 4.4.1: "Constante de Disociación ácido-base"**).

Con la finalidad de determinar si la composición de la solución *buffer* se encontraba involucrada en el proceso de decoloración de NRBr, este compuesto se evaluó en agua Milli-Q® (pH=5,76) (**Figura 4.12**).

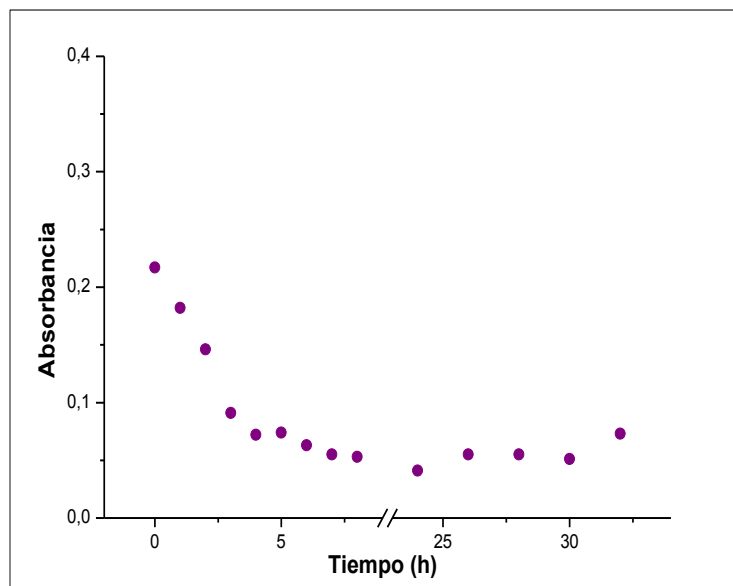


Figura 4.12: Estudio de estabilidad de NRBr ($\lambda=543$ nm) en solución acuosa de pH=5,76.

Los resultados obtenidos evidenciaron una decoloración comparable a la observada en solución *buffer* pH=5,8 (**Figura 4.11.B**). Por lo tanto, la composición del *buffer* no se encuentra implicada en este efecto y la decoloración que presentó el compuesto NRBr en *buffer* pH=5,8 y 7,4 es debido a la presencia de la especie neutra del FS.

4.4.3.2- Estudios de Fotoestabilidad

Con la finalidad de complementar los ensayos de estabilidad realizados con NR y su nuevo derivado monobromado, se desarrollaron estudios de fotoestabilidad en *buffer* pH=7,4; validando previamente la metodología (**Tabla 4.6**). Siendo que en este medio predomina la especie neutra de NRBr, se adicionaron 250 μ L de ácido clorhídrico 0,1 M, previo a la determinación espectrofotométrica, a fin de regenerar la especie catiónica coloreada. A fin de comparar los resultados obtenidos para ambos FS, se adicionó también ácido clorhídrico a las soluciones de NR. El comportamiento de NR y NRBr se observa en la **Figura 4.13.A** y **Figura 4.13.B**, respectivamente.

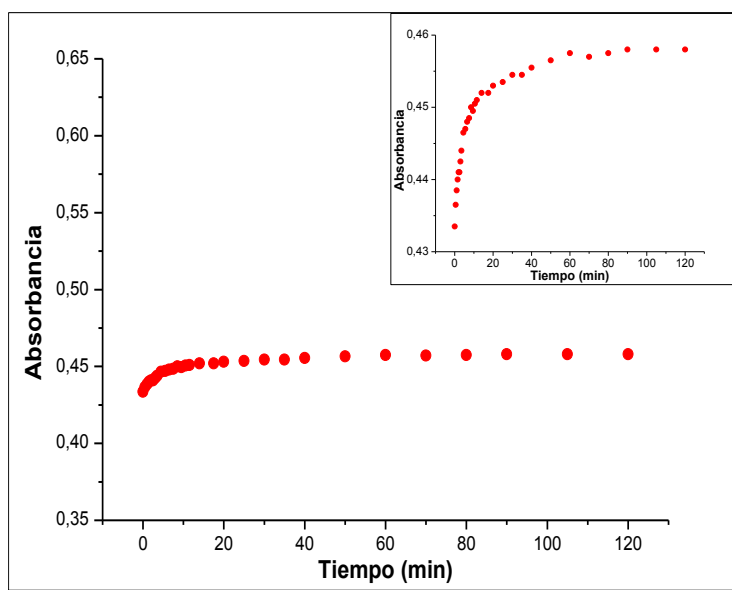


Figura 4.13.A: Fotoestabilidad de NR ($\lambda=530$ nm) en *buffer* pH=7,4.

Tabla 4.6: Validación del método analítico empleando UV-Visible aplicable a estudios de fotoestabilidad de *Neutral Red* y *Neutral Red monobromado* en *buffer* pH=7,4.

Compuesto	Exactitud		Precisión				Rango ($\mu\text{g/mL}$)	LD ($\mu\text{g/mL}$)	LC ($\mu\text{g/mL}$)
	n=3	n=9	SD		RSD				
			n=3	n=9	n=3	n=9			
NR	98,9		0,43		0,43				
	101	99,4	0,10	1,3	0,10	1,3	6-17	0,68	2,1
	98,5		0,16		0,16				
NRBr	99,4		1,0		1,0				
	102	99,9	0,50	1,4	0,49	1,4	6-18	0,73	2,2
	98,8		0,27		0,27				

SD: Desviación estándar; RSD: Desviación estándar relativa; LD: Límite de detección; LC: Límite de cuantificación.

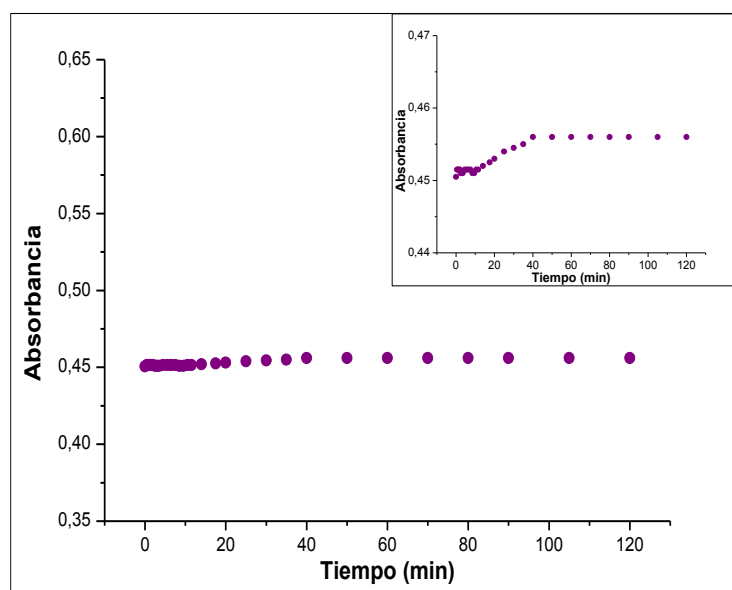


Figura 4.13.B: Fotoestabilidad de NRBr ($\lambda=534$ nm) en *buffer* pH=7,4.

El análisis de los resultados obtenidos evidenció para ambos compuestos un incremento de la absorbancia durante los primeros minutos de ensayo y luego de transcurrido un determinado tiempo, la absorbancia se mantuvo constante (**Figura 4.13.A inserto** y **Figura 4.13.B inserto**). El reactivo de partida demostró este efecto más pronunciado en comparación con el nuevo derivado.

Las curvas espectrales de ambos FS se registraron al inicio de la experiencia ($t=0$ min) y al finalizar la misma ($t=120$ min). Como se desprende del análisis de la **Figura 4.14**, los espectros de absorción normalizados de NR evidenciaron un desplazamiento hipsocrómico de 3 nm de la curva espectral final ($t=120$ min) con respecto a la inicial ($t=0$ min). Por su parte, las curvas correspondientes al nuevo FS bromado son superponibles (**Figura 4.15**). Éstos resultados se corroboraron por RP-HPLC, lo que sugirió la ausencia de productos de degradación.

El comportamiento que presentaron ambos FS a tiempos menores a 60 minutos, no se ajustó a un esquema típico de fotodegradación, reportado en literatura para compuestos estructuralmente similares.^{68,69} Por tal motivo, se desarrollaron estudios de estabilidad química con protección de la luz, para ambos compuestos en *buffer* pH=7,4 y temperatura ambiente, a fin de comparar con los resultados obtenidos en el estudio de fotoestabilidad. Los resultados obtenidos indicaron

que el incremento de la absorbancia a tiempos menores a 60 minutos no es producido por la irradiación.

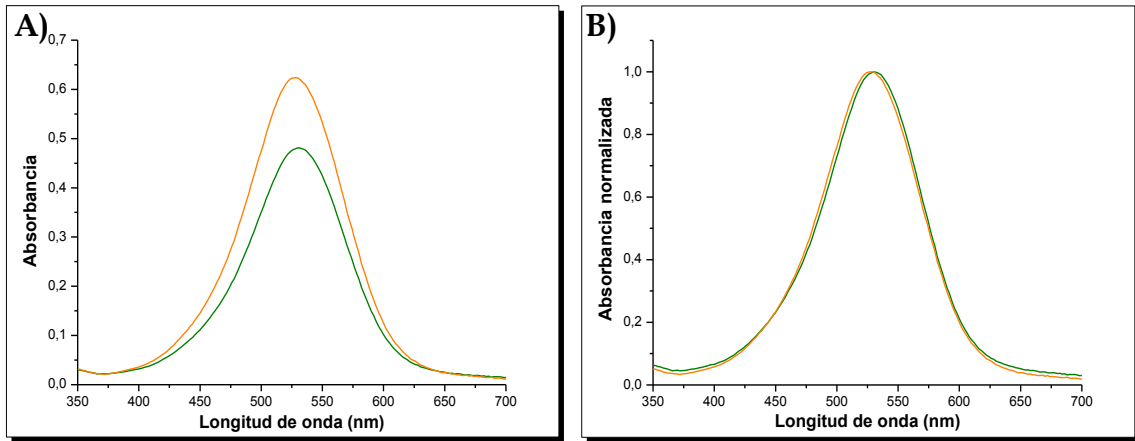


Figura 4.14: Fotoestabilidad de NR en *buffer* pH=7,4. (—) t=0 min, (—) t=120 min. **A)** Curvas espectrales; **B)** Curvas espectrales normalizadas.

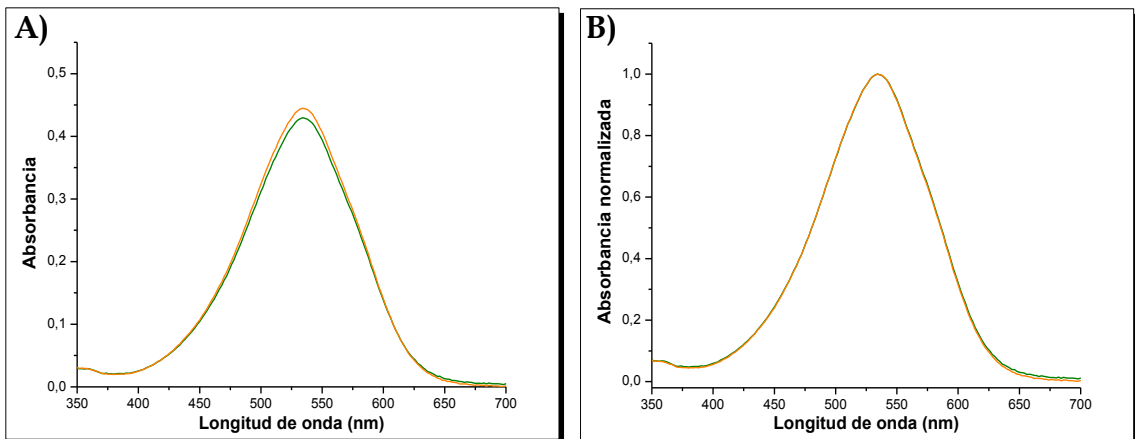


Figura 4.15: Fotoestabilidad de NRBr en *buffer* pH=7,4. (—) t=0 min, (—) t=120 min. **A)** Curvas espectrales; **B)** Curvas espectrales normalizadas.

Numerosos trabajos científicos afirman que el fenómeno de agregación es influenciado por la presencia de sales en solución, ya que los iones producen un aumento de la constante dieléctrica del medio, disminuyendo la repulsión

electrostática entre las moléculas de FS, y favorecen de este modo la agregación del compuesto.^{53,55}

Los resultados obtenidos para NR y el nuevo FS bromado evidenciaron que la representación gráfica de la absorbancia al máximo de la curva espectral en función del tiempo se ajustó a una sigmoidea a tiempos menores a 60 minutos (**Figura 4.13.A** y **Figura 4.13.B**). Resultados similares se reportaron para un compuesto de la Familia de las Cianinas que se evaluó en presencia de nitrato de manganeso, atribuyendo la tendencia observada, al incremento del estado de agregación molecular.⁷⁰

Además, las curvas espectrales de NR en función de la concentración de FS, en diversas soluciones *buffer*, evidenció un desplazamiento hipsocrómico del máximo de la curva espectral, el cual se atribuyó a la formación de agregados superiores (**Sección 3.4.1.3: "Evaluación de la agregación en soluciones buffer"**). La misma tendencia, se observó para este compuesto en función del tiempo, evidenciando un desplazamiento hipsocrómico de 3 nm. Es relevante destacar que este comportamiento fue más marcado para el precursor en comparación con el derivado bromado, siendo esto coincidente con la mayor tendencia a la agregación presentada por NR.

Los antecedentes bibliográficos permiten postular que la presencia de sales en las condiciones del ensayo condujo a un incremento del estado de agregación de los FS en función del tiempo. Por lo tanto, ambos compuestos demostraron ser fotoestables en las condiciones ensayadas, empleando una lámpara LED que presenta un rango de emisión en la región visible del espectro electromagnético y produce una adecuada excitación de los compuestos. Por estas razones, se empleó esta fuente de luz en los ensayos de determinación de oxígeno singlete y en las actividades vinculadas a la evaluación de la IFD.

4.4.4- Oxígeno Singlete

4.4.4.1- Familia de las Azinas

En la **Figura 4.16** se muestra la representación gráfica correspondiente a la reacción de fotodescomposición de DMA fotosensibilizada por NR, el nuevo

derivado monobromado y MB como referencia. La **Tabla 4.7** resume los valores de la constante de velocidad observada (k_{obs}) y ϕ_{Δ} de los FS evaluados, determinados según la **Ecuación 4.6**.

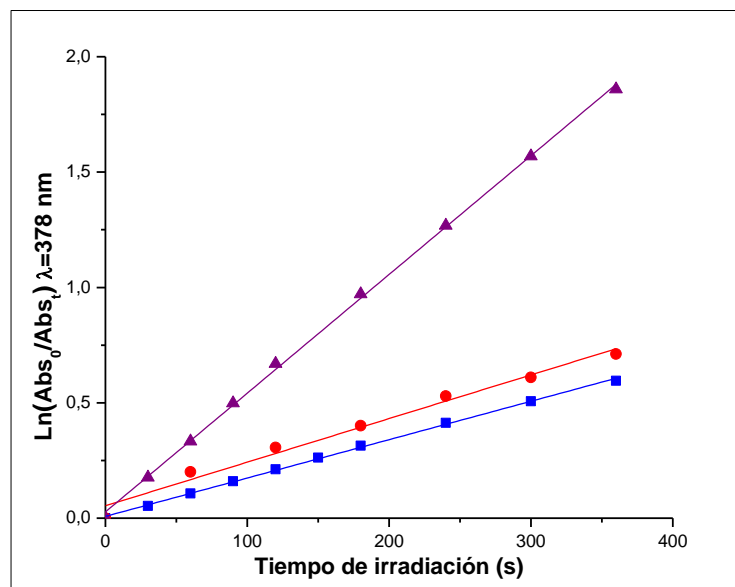


Figura 4.16: Cinética de primer orden de la reacción de fotooxidación de DMA en DMF, fotosensibilizada por (■) *Methylene Blue*, (●) *Neutral Red* y (▲) *Neutral Red* monobromado.

Tabla 4.7: Parámetros cinéticos de la reacción de fotooxidación de DMA y rendimiento cuántico de oxígeno singlete (ϕ_{Δ}) en DMF.

Compuesto	k_{obs} ($\times 10^{-4}$)(s^{-1})	r^2	ϕ_{Δ}^*
MB	$16,6 \pm 0,2$	0,999	1,00
NR	19 ± 1	0,981	1,16
NRBr	$51,5 \pm 0,5$	0,999	3,14

*Relativos a MB

El análisis de los resultados obtenidos, permite señalar un valor de $\phi_{\Delta}=1,16$ para NR a una $\lambda_{\max}=450$ nm. En literatura se reportó para este FS un valor de $\phi_{\Delta}=0,18$, realizando la determinación a $\lambda_{\max}=536$ nm, mediante la evaluación de la fotooxidación de 1,3-difenilisobenzofurano en metanol, utilizando MB como sustancia de referencia.⁷¹ Recientemente, se reportó un valor de $\phi_{\Delta}=0,15$ para NR, determinado mediante Espectroscopia de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) empleando la técnica de *spin trapping* en *buffer* fosfato pH=7,4. Éstas determinaciones se realizaron utilizando el compuesto diamagnético 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona (TEMP), el cual actúa como atrapador (*quencher*) que en presencia de $^1\text{O}_2$ forma la especie paramagnética, 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona-N-oxil (TEMPO).⁵⁸

Sin reportar valores específicos, otro estudio estimó que el Φ_{Δ} para NR es mucho menor que el valor correspondiente a *Rose Bengal* (Familia de los Xantenos).⁵² Otros autores consideraron a NR como un FS Tipo I, debido a los bajos valores de $^1\text{O}_2$ determinados en medio acuoso empleando algas fotosintéticas.⁷²

La eficiencia cuántica de generación de $^1\text{O}_2$ se encuentra influenciada por numerosos factores, tales como la longitud de onda de excitación del FS, la intensidad de irradiación y el medio de evaluación. Un ejemplo de esto lo constituye el compuesto altamente coloreado *Indigo Carmine*, cuyo $\phi_{\Delta}=0,095$ en *buffer* fosfato pH=7,4; en tanto que dicho parámetro se estimó en el intervalo 0,3-0,6 empleando DMSO.^{58,73}

Considerando la tendencia de agregación que presentó el compuesto NR en diferentes medios (**Capítulo 3: "Estudios de Agregación"**), las bandas de absorción a 450 nm y 536 nm, corresponden a la forma monomérica y agregada, respectivamente. Siendo que la producción de $^1\text{O}_2$ puede ser disminuida por la presencia de la especie agregada del FS en solución,⁵⁴ el valor de ϕ_{Δ} informado en literatura para NR, en comparación con la determinación realizada en el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral, podría explicarse considerando estrictamente las condiciones experimentales. En el presente estudio, el FS se evaluó sólo como especie monomérica; y el valor de ϕ_{Δ} determinado fue mayor que el correspondiente al FS de referencia, MB. Además, el menor valor

reportado en literatura atribuible a la especie agregada de NR, es coincidente con que ésta especie conduce a una disminución de la producción de $^1\text{O}_2$, afirmando que NR no actuaría mediante procesos Tipo II.

La determinación de ϕ_Δ para el nuevo FS bromado, NRBr, evidenció claramente una alta eficiencia en la producción de $^1\text{O}_2$, superando en $\sim 2,7$ veces la determinada para el precursor en idénticas condiciones experimentales. Esto podría explicarse en términos del “efecto del átomo pesado” ya que la introducción de átomos con alto número atómico en la estructura molecular (como el átomo de bromo), favorece el cruce entre sistemas por acoplamiento spin-órbita, conduciendo a un incremento en la formación de las especies en estado triplete excitado.^{49,50} Éste posee mayor tiempo de vida media que el estado singlete y es el principal responsable de la formación de ERO, evidenciado mediante el incremento de la producción de $^1\text{O}_2$.^{41,44}

Una tendencia comparable en relación al incremento de ϕ_Δ se informó para otros compuestos estructuralmente relacionados, en los cuales la halogenación de los precursores (yodación y bromación) condujo a un incremento significativo de la eficiencia de producción de $^1\text{O}_2$, mejorando la capacidad fotosensibilizadora de los derivados.^{22,32,49}

4.4.4.2- Familia de las Oxazinas y Oxazonas

La evaluación del ϕ_Δ se desarrolló de manera análoga a la metodología empleada para la Familia de las Azinas. El progreso de la reacción de fotooxidación de DMA en presencia de los compuestos pertenecientes a la Familia de las Oxazinas (CV y CVBr₃) y Oxazonas (CR y CRBr₃), empleando DMF como solvente, se presenta en la **Figura 4.17**. A partir de esta representación gráfica, se determinaron los valores de la constante de velocidad observada (k_{obs}), calculando posteriormente el ϕ_Δ aplicando la **Ecuación 4.6**. Los resultados obtenidos de la reacción de DMA y el ϕ_Δ determinado se presentan en la **Tabla 4.8**.

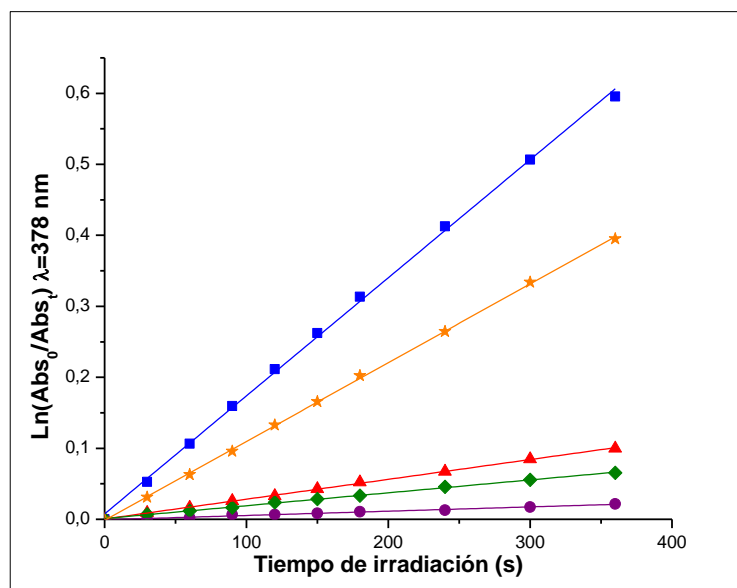


Figura 4.17: Cinética de primer orden de la reacción de fotooxidación de DMA en DMF, fotosensibilizada por (■) *Methylene Blue*, (●) *Cresyl Violet*, (▲) *Cresyl Red*, (◆) *Cresyl Violet* tribromado, (★) *Cresyl Red* tribromado.

Tabla 4.8: Parámetros cinéticos de la reacción de fotooxidación de DMA y rendimiento cuántico de oxígeno singlete (ϕ_{Δ}) en DMF.

Compuesto	$k_{obs} (x10^{-5})(s^{-1})$	r^2	ϕ_{Δ}^*
MB	166 ± 2	0,999	1,00
CV	$6,0 \pm 0,3$	0,984	0,04
CVBr ₃	$18,2 \pm 0,2$	0,999	0,11
CR	$27,9 \pm 0,2$	0,999	0,17
CRBr ₃	$111,0 \pm 0,7$	0,999	0,65

*Relativos a MB

Los compuestos no sustituidos, CV y CR, evidenciaron bajos valores de ϕ_{Δ} en comparación con el FS de referencia, MB, razón por la cual no son considerados buenos productores de 1O_2 .

Los valores de ϕ_{Δ} que presentaron los compuestos correspondientes a la Familia de las Oxazinas y Oxazonas es, probablemente, una consecuencia de su bajo acoplamiento intrínseco spin-orbital.⁴⁹ Es ampliamente conocido que la incorporación de un anillo benzo[α] en estructuras tricíclicas, como es el caso de las Oxazinas y las Oxazonas, si bien produce un incremento en la longitud de onda de máxima absorción, conduce a una disminución del ϕ_{Δ} , lo que permite explicar los valores obtenidos en comparación con los compuestos de la Familia de las Azinas.⁷⁴

Se ha demostrado que el estado singlete excitado de *Nile Blue A* (Familia de las Oxazinas) y *Nile Red* (Familia de las Oxazonas) no evoluciona al estado triplete excitado y emite la energía mediante fluorescencia, conduciendo a elevados rendimientos cuánticos de fluorescencia y baja producción de $^1\text{O}_2$.⁷⁵ También se ha informado un alto valor de rendimiento cuántico de fluorescencia para CV, por lo cual ha sido propuesto como estándar para determinaciones de rendimientos cuánticos de fluorescencia.⁷⁶

Al comparar los valores obtenidos para CV ($\phi_{\Delta}=0,04$) y CR ($\phi_{\Delta}=0,17$) en DMF, éste último presentó un rendimiento $\sim 4,25$ veces mayor que CV, lo cual se debe a que el precursor CR presenta un grupo carbonilo en la estructura molecular. Este grupo funcional favorece el cruce entre sistemas desde el estado singlete excitado al estado triplete excitado, produciendo un incremento en las probabilidades de interacción con el oxígeno molecular para generar la especie reactiva $^1\text{O}_2$.⁷⁷

La eficiencia de producción de $^1\text{O}_2$ para los nuevos derivados bromados, CVBr₃ ($\phi_{\Delta}=0,11$) y CRBr₃ ($\phi_{\Delta}=0,65$), exhibió la tendencia esperada en concordancia con lo informado en literatura.⁴⁹ Los compuestos CVBr₃ y CRBr₃ presentaron valores de $\phi_{\Delta} \sim 2,7$ y $3,8$ veces superiores a sus respectivos precursores, lo cual se explica en términos del “efecto de átomo pesado”. El derivado CVBr₃ demostró un valor bajo de ϕ_{Δ} , sin embargo el compuesto polibromado, CRBr₃, presentó un valor aceptable, mayor que el correspondiente para CVBr₃. El nuevo derivado halogenado de CR presenta en su estructura molecular dos modificaciones químicas que explican los resultados obtenidos y favorecen el cruce entre

sistemas, los átomos de bromo y el grupo carbonilo característico de la Familia de las Oxazonas.

El empleo de la estrategia del “efecto del átomo pesado” condujo a agentes FS altamente efectivos.^{22,32,49} Cabe destacar que *Nile Blue A* (Familia de las Oxazinas) evidenció un incremento significativo de la fotoactividad como consecuencia de la introducción de átomos de halógeno en la estructura, estableciendo una correlación entre el ϕ_{Δ} y la fototoxicidad.⁴⁹

Considerando que el medio empleado en la determinación del ϕ_{Δ} tiene un impacto significativo,⁵⁸ y con la finalidad de corroborar los datos obtenidos para los precursores, se evaluó la producción de $^1\text{O}_2$ empleando metanol en el desarrollo experimental. En la **Tabla 4.9** se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 4.9: Parámetros cinéticos de la reacción de fotooxidación de DMA y rendimiento cuántico de oxígeno singlete (ϕ_{Δ}) en metanol.

Compuesto	$k_{\text{obs}} (\times 10^{-6})(\text{s}^{-1})$	r^2	ϕ_{Δ}^*
MB	781 ± 4	0,999	1,00
CV	15 ± 3	0,710	0,02
CR	43 ± 4	0,912	0,06

*Relativos a MB

El análisis de esta experiencia permitió concluir que los valores determinados en metanol para estas Familias de FS, demostraron ser incluso menores que los obtenidos en DMF, lo que podría relacionarse con el efecto de la agregación de los compuestos ensayados (**Capítulo 3: “Estudios de Agregación”**).

4.5- CONCLUSIONES

Las actividades desarrolladas permitieron determinar de manera satisfactoria el valor de pK_a del nuevo derivado NRBr y corroborar el valor reportado en

literatura para su precursor NR. Ambos compuestos FS experimentan reacciones de protonación/desprotonación, evidenciando el efecto del pH del medio. El derivado monobromado presentó un menor valor de pK_a en comparación con su precursor, comportamiento que se corresponde con antecedentes bibliográficos. Esta importante característica podría ser beneficiosa para el nuevo derivado ya que facilitaría la incorporación celular del nuevo FS.

Mediante el desarrollo de un método cromatográfico empleando RP-HPLC se determinaron de manera satisfactoria los valores experimentales de lipofilidad de los compuestos ensayados en esta Tesis Doctoral. Los nuevos FS bromados (NRBr, CVBr₃ y CRBr₃) demostraron ser más lipofílicos en comparación con sus respectivos precursores, lo que podría contribuir de manera sólida al incremento de la eficacia fotodinámica de los nuevos derivados. Además, se evidenciaron muy buenas correlaciones entre los parámetros lipofílicos experimentales y los valores obtenidos mediante cálculos teóricos con todos los programas aplicados. Además, la estabilidad química y fotoquímica de NR y NRBr se evaluó mediante el desarrollo y validación de metodologías analíticas adecuadas, estableciendo que ambos compuestos son estables en los diferentes medios ensayados.

Las experiencias realizadas en relación a la determinación de ¹O₂ permitieron demostrar que los FS pertenecientes a la Familia de las Azinas son muy buenos productores, siendo importante destacar que las determinaciones se realizaron con la forma monomérica del compuesto. Los resultados obtenidos para todos los FS ensayados, confirmaron lo reportado en literatura con relación a que la halogenación conduce a un incremento del ϕ_{Δ} , lo cual se corresponde con el efecto esperado de los átomos pesados sobre el acoplamiento spin-órbita entre los estados singlete y triplete.

4.6- BIBLIOGRAFÍA

[1]- W.O. Foye, T.L. Lemke, D.A. Williams. FOYE'S Principles of Medicinal Chemistry. 6th Edition. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA. 2008.

- [2]- M.C. Avendaño López. Introducción a la química farmacéutica. 2^{da} Edición. S.A. McGraw-Hill - Interamericana de España. Madrid. 2001.
- [3]- M. Lilletvedt, H.H. Tønnesen, A. Høgset, S.A. Sande, S. Kristensen. Evaluation of physicochemical properties and aggregation of the photosensitizers TPCS_{2a} and TPPS_{2a} in aqueous media. *Pharmazie*. 2011; 66 (5): 325-333.
- [4]- D.T. Manallack. The pK_a distribution of drugs: application to drug discovery. *Perspect Medicin Chem*. 2007; 1: 25-38.
- [5]- A.L. Tessaro, V.R. Batistela, A.C. Gracetto, H.P.M. Oliveira, R.L. Sernaglia, V.R. de Souza, W. Caetano, N. Hioka. Stability of benzoporphyrin photosensitizers in water/ethanol mixtures: pK_a determination and self-aggregation processes. *J Phys Org Chem*. 2011; 24 (2): 155-161.
- [6]- B. Čunderliková, O. Kaalhus, R. Čunderlík, A. Mateášik, J. Moan, M. Kongshaug. pH-dependent modification of lipophilicity of porphyrin-type photosensitizers. *Photochem Photobiol*. 2004; 79 (3): 242-247.
- [7]- J. Sobczyński, H.H. Tønnesen, S. Kristensen. Influence of aqueous media properties on aggregation and solubility of four structurally related meso-porphyrin photosensitizers evaluated by spectrophotometric measurements. *Pharmazie*. 2013; 68 (2): 100-109.
- [8]- L.Y. Xie, D. Dolphin. Protonation of porphocyanine. A new expanded tetrapyrrolic macrocycle. *Can J Chem*. 1995; 73 (12): 2148-2152.
- [9]- M.C. Desroches, S. Layac, P. Prognon, P. Maillard, D.S. Grierson, E. Curis, I. Nicolis, A. Kasselouri. Speciation of new tri- and tetra-glucoconjugated tetrapyrrolic macrocycles (porphyrins and chlorins): an electronic molecular spectroscopy study. *Appl Spectrosc*. 2003; 57 (8): 950-959.
- [10]- M.K. Singh, H. Pal, A.C. Bhasikuttan, A.V. Sapre. Photophysical properties of the cationic form of neutral red. *Photochem Photobiol*. 1999; 69 (5): 529-535.
- [11]- M.K. Singh, H. Pal, A.C. Bhasikuttan, A.V. Sapre. Dual solvatochromism of neutral red. *Photochem Photobiol*. 1998; 68 (1): 32-38.
- [12]- C. Sousa, T. Sá e Melo, M. Gèze, J.M. Gaullier, J.C. Mazière, R. Santus. Solvent polarity and pH effects on the spectroscopic properties of neutral red:

application to lysosomal microenvironment probing in living cells. *Photochem Photobiol.* 1996; 63 (5): 601-607.

[13]- M.K. Singh, H. Pal, A.S.R. Koti, A.V. Sapre. Photophysical properties and rotational relaxation dynamics of neutral red bound to β -cyclodextrin. *J Phys Chem A.* 2004; 108 (9): 1465–1474.

[14]- J. Goicoechea, F.J. Arregui, J.M. Corres, I.R. Matias. Study and optimization of self-assembled polymeric multilayer structures with neutral red for pH sensing applications. *J Sensors.* 2008; 2008: 1-7. ID 142854.

[15]- J. Mohanty, A.C. Bhasikuttan, W.M. Nau, H. Pal. Host-guest complexation of neutral red with macrocyclic host molecules: contrasting pKa shifts and binding affinities for cucurbit[7]uril and β -cyclodextrin. *J Phys Chem B.* 2006; 110 (10): 5132–5138.

[16]- V.E. Nicotra, M.F. Mora, R.A. Iglesias, A.M. Baruzzi. Spectroscopic characterization of thionine species in different media. *Dyes Pigments.* 2008; 76 (2): 315-318.

[17]- D. Casoni, C.S. Cobzac, C. Sarbu. A comparative study concerning the lipophilicity of some synthetic dyes estimated by thin layer chromatography and different computation methods. *Rev Chim.* 2010; 61 (3): 229-234.

[18]- K. Sztanke, W. Markowski, R. Swieboda, B. Polak. Lipophilicity of novel antitumour and analgesic active 8-aryl-2,6,7,8-tetrahydroimidazo[2,1c][1,2,4]triazine-3,4-dione derivatives determined by reversed-phase HPLC and computational methods. *Eur J Med Chem.* 2010; 45 (6): 2644-2649.

[19]- K. Valkó. Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution. *J Chromatogr A.* 2004; 1037 (1-2): 299-310.

[20]- S. Ravetti, M.S. Gualdesi, M.C. Briñón. Lipophilicity of 5'-carbonates of lamivudine with antiretroviral activity. Correlation between different methods. *J Liq Chrom Rel Technol.* 2008; 31 (5-8): 1014–1032.

[21]- R.S. Cavalcante, H. Imasato, V.S. Bagnato, J.R. Perussi. A combination of techniques to evaluate photodynamic efficiency of photosensitizers. *Laser Phys Lett.* 2009; 6 (1): 64-70.

- [22]- M. Wainwright, R.M. Giddens. Phenothiazinium photosensitisers: choices in synthesis and application. *Dyes Pigments*. 2003; 57 (3): 245-257.
- [23]- E.G. Friberg, B. Cunderlíkova, E.O. Pettersen, J. Moan. pH effects on the cellular uptake of four photosensitizing drugs evaluated for use in photodynamic therapy of cancer. *Cancer Lett*. 2003; 195 (1): 73-80.
- [24]- P. Kus, V. Kozik, M. Rojkiewicz, A. Sochanik, A. Szurko, M. Kempa, P. Kozub, M. Rams-Baron, K. Jarzembek, M. Stefaniak, J. Sakowicz. The synthesis of new potential photosensitizers. Part 3. Tetraphenylporphyrin esters of profens. *Dyes Pigments*. 2015; 116: 46-51.
- [25]- J.M. Pallicer, S. Pous-Torres, J. Sales, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch. Determination of the hydrophobicity of organic compounds measured as log $P_{O/W}$ through a new chromatographic method. *J Chromatogr A*. 2010; 1217 (18): 3026-3037.
- [26]- R. Pignatello, G. Puglisi. Lipophilicity evaluation by RP-HPLC of two homologous series of methotrexate derivatives. *Pharm Acta Helv*. 2000; 74 (4): 405-410.
- [27]- B. Hallgasa, Z. Dobos, E. Ósz, F. Hollósy, R. E. Schwab, E. Z. Szabó, D. Erős, M. Idei, G. Kéri, T. Lóránd. Characterization of lipophilicity and antiproliferative activity of E-2-arylmethylene-1-tetralones and their heteroanalogues. *J Chromatogr B*. 2005; 819 (2): 283-291.
- [28]- A.V. Rudraraju, P.N.A. Amoyaw, T.J. Hubin, M.O.F. Khan. Determination of log P values of new cyclen based antimalarial drug leads using RP-HPLC. *Pharmazie*. 2014; 69 (9): 655-662.
- [29]- F. Kobarfard, A. Khalaj, F. Daryaei, Z. Ardeshtir Larijany, R. Saeed. Correlation between different lipophilicity parameters and antimycobacterial activities of 2-hydroxyacetamides. *DARU J Pharm Sci*. 2008; 16 (2): 55-59.
- [30]- C. Yamagami, K. Kawase, K. Iwaki. Hydrophobicity parameters determined by reversed-phase liquid chromatography. XV: optimal conditions for prediction of log P_{oct} by using RP-HPLC procedures. *Chem Pharm Bull*. 2002; 50 (12): 1578-1583.

- [31]- J. Flieger, M. Tatarczak-Michalewska, M. Wujec, M. Pitucha, R. Świeboda. RP-HPLC analysis and in vitro identification of antimycobacterial activity of novel thiosemicarbazides and 1,2,4-triazole derivatives. *J Pharm Biomed Anal.* 2015; 107: 501–511.
- [32]- M. Wainwright. Photosensitizers in biomedicine. 1^{ra} Edición. John Wiley & Sons Ltd. United Kingdom. 2009.
- [33]- S.B. Roncoe, N.A. Rakow, M.L. Husberg, L.H. McIntosh, inventors. 3M Innovative Properties Company, assignee. Methods of formulating a pharmaceutical composition. US patente 0065062A1. Marzo de 2005.
- [34]- R.W. Horobin, J.C. Stockert, F. Rashid-Doubell. Fluorescent cationic probes for nuclei of living cells: why are they selective? A quantitative structure–activity relations analysis. *Histochem Cell Biol.* 2006; 126 (2): 165–175.
- [35]- J.T. Piechocki, K. Thoma, Editors. Pharmaceutical photostability and stabilization technology. Drugs and the Pharmaceutical Sciences. New York. 2010.
- [36]- K.A. Connors, G.L. Amidon, V.J. Stella. Chemical Stability of Pharmaceuticals. 2nd Edition. John Wiley & Sons Ltd. New York. 1986.
- [37]- V. Andrisano, R. Ballardini, P. Hrelia, N. Cameli, A. Tosti, R. Gotti, V. Cavrini. Studies on the photostability and in vitro phototoxicity of Labetalol. *Eur J Pharm Sci.* 2001; 12 (4): 495-504.
- [38]- M. Rojkiewicz, P. Kuś, P. Kozub, M. Kempa. The synthesis of new potential photosensitizers. Part 2. Tetrakis- (hydroxyphenyl) porphyrins with long alkyl chain in the molecule. *Dyes Pigments.* 2013; 99: 627-635.
- [39]- S. Silchenko, Schöneich C, Carlson BJ, Stella VJ. Photostability of 2-hydroxymethyl-4,8-dibenzo[1,2-b:5,4-b']dithiophene-4,8-dione (NSC 656240), a potential anticancer drug. *Int J Pharm.* 2003; 264 (1-2): 97-105.
- [40]- C.A. Robertson, D.H. Evans, H. Abrahamse. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photochem Photobiol B.* 2009; 96 (1): 1-8.

- [41]- S. Yano, S. Hirohara, M. Obata, Y. Hagiya, S. Ogura, A. Ikeda, H. Kataoka, M. Tanaka, T. Joh. Current states and future views in photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol C*. 2011; 12 (1): 46-67.
- [42]- E. Paszko, C. Ehrhardt, M.O. Senge, D.P. Kelleher, J.V. Reynolds. Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2011; 8 (1): 14-29.
- [43]- A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin. Mechanisms in photodynamic therapy: part one. Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2004; 1 (4): 279-293.
- [44]- Y.N. Konan, R. Gurny, E. Allémann. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2002; 66 (2): 89-106.
- [45]- M.D. Maree, N. Kuznetsova, T. Nyokong. Silicon octaphenoxyphthalocyanines: photostability and singlet oxygen quantum yields. *J Photochem Photobiol A*. 2001; 140 (2): 117-125.
- [46]- J.P. Tardivo, A.D. Giglio, C. Santos de Oliveira, D.S. Gabrielli, H.C. Junqueira, D.B. Tada, D. Severino, R.F. Turchiello, M.S. Baptista. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2005; 2 (3): 175-191.
- [47]- C.B. Nielsen, M. Johnsen, J. Arnbjerg, M. Pittelkow, S.P. McIlroy, P.R. Ogilby, M. Jørgensen. Synthesis and characterization of water-soluble phenylene-vinylene-based singlet oxygen sensitizers for two-photon excitation. *J Org Chem*. 2005; 70 (18): 7065-7079.
- [48]- M. Kotulska, J. Kulbacka, J. Sączko. Advances in photodynamic therapy assisted by electroporation. *Curr Drug Metab*. 2013; 14 (3): 309-318.
- [49]- L. Cincotta, J.W. Foley, A.H. Cincotta. Novel Red absorbing benzo[α]phenoxazinium and benzo[α]phenothiazinium photosensitizers: in vitro evaluation. *Photochem Photobiol*. 1987; 46 (5): 751-758.
- [50]- W.M. Sharman, J.E. van Lier. Synthesis and photodynamic activity of novel asymmetrically substituted fluorinated phthalocyanines. *Bioconjug Chem*. 2005; 16 (5): 1166-1175.

- [51]- E. Gandin, Y. Lion, A. Van de Vorst. Quantum yield of singlet oxygen production by Xanthene derivatives. *Photochem Photobiol.* 1983; 37 (3): 271-278.
- [52]- B.B. Fischer, A. Krieger-Liszkay, R.I.L. Eggen. Oxidative stress induced by the photosensitizers neutral red (type I) or rose bengal (type II) in the light causes different molecular responses in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* 2005; 168 (3): 747-759.
- [53]- O. Valdes-Aguilera, D.C. Neckers. Aggregation Phenomena in Xanthene Dyes. *Acc Chem Res.* 1989; 22 (5): 171-177.
- [54]- C.K. Lim, J. Heo, S. Shin, K. Jeong, Y.H. Seo, W.D. Jang, C.R. Park, S.R. Park, S. Kim, I.C. Kwon. Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of Cancer. *Cancer Lett.* 2013; 334 (2): 176-187
- [55]- K.T. Arun, B. Epe, D. Ramaiah. Aggregation behavior of halogenated squaraine dyes in buffer, electrolytes, organized media, and DNA. *J Phys Chem B.* 2002; 106 (44): 11622-11627.
- [56]- E. Gross, B. Ehrenberg, F.M. Johnson. Singlet oxygen generation by porphyrins and the kinetics of 9,10-dimethylanthracene photosensitization in liposomes *Photochem Photobiol.* 1993; 57 (5): 808-813.
- [57]- E. Albiter, S. Alfaro, M.A. Valenzuela. Photosensitized oxidation of 9,10-dimethylanthracene on dye-doped silica composites. *Int J Photoenergy.* 2012; (2012): 1-8. ID 987606.
- [58]- L. Kovács, F. Ayaydin, T. Kálai, J. Tandori, P.B. Kós, E. Hideg. Assessing the applicability of singlet oxygen photosensitizers in leaf studies. *Photochem Photobiol.* 2014; 90: 129-136.
- [59]- S. Pinsuwan, A. Li, S.H. Yalkowsky. Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients. *J Chem Eng Data.* 1995; 40 (3): 623-626.
- [60]- S. Griffin, S. Grant Wyllie, J. Markham. Determination of octanol-water partition coefficient for terpenoids using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 1999; 864 (2): 221-228.
- [61]- Z. Mrkvičková, P. Kovaříková, S. Balíková, J. Klimeš. Determination of lipophilicity of novel potential antituberculosic agents using HPLC on monolithic

stationary phase and theoretical calculations. *J Pharm Biomed Anal.* 2008; 48 (2): 310-314.

[62]- M.B. Ballatore, M.B. Spesia, M.E. Milanesio, E.N. Durantini. Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of porphyrin-fullerene C₆₀ dyads with application in the photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus*. *Eur J Med Chem.* 2014; 83: 685-694.

[63]- S.J. Mora, M.E. Milanesio, E.N. Durantini. Spectroscopic and photodynamic properties of 5,10,15,20-tetrakis [4-(3-N,N-dimethylaminopropoxy)phenyl] porphyrin and its tetracationic derivative in different media. *J Photochem Photobiol A.* 2013; 270: 75-84.

[64]- S. Basu, S. Panigrahi, S. Praharaj, S.K. Ghosh, S. Pande, S. Jana, A. Pal, T. Pal. Solvent effect on the electronic spectra of azine dyes under alkaline condition. *J Phys Chem A.* 2007; 111 (4): 578-583.

[65]- C.W. Lin, J.R. Shulok, S.D. Kirley, L. Cincotta, J.W. Foley. Lysosomal localization and mechanism of uptake of Nile blue photosensitizers in tumor cells. *Cancer Res.* 1991; 51 (10): 2710-2719.

[66]- M.N. Montes de Oca, J. Vara, L. Milla, V. Rivarola, C.S. Ortiz. Physicochemical properties and photodynamic activity of novel derivatives of triarylmethane and thiazine. *Arch Pharm.* 2013; 346 (4): 255-265.

[67]- S.A. Gorman, A.L. Bell, J. Griffiths, D. Roberts, S.B. Brown. The synthesis and properties of unsymmetrical 3,7-diaminophenothiazin-5-ium iodide salts: Potential photosensitisers for photodynamic therapy. *Dyes Pigments.* 2006; 71: 153-160.

[68]- C. Gómez-Solís, I. Juárez-Ramírez, E. Moctezuma, L.M. Torres-Martínez. Photodegradation of indigo carmine and methylene blue dyes in aqueous solution by SiC-TiO₂ catalysts prepared by sol-gel. *J Hazard Mater.* 2012; 217-218: 194-199.

[69]- T. Zhang, T. Oyama, S. Horikoshi, H. Hidaka, J. Zhao, N. Serpone. Photocatalyzed N-demethylation and degradation of methylene blue in titania dispersions exposed to concentrated sunlight. *Sol Energ Mat Sol C.* 2002; 73: 287-303.

- [70]- T.D. Slavnova, A.K. Chibisov, H. Görner. Kinetics of salt-induced J-aggregation of cyanine dyes. *J Phys Chem A*. 2005; 109 (21): 4758-4765.
- [71]- D.A. Phoenix, Z. Sayed, S. Hussain, F. Harris, M. Wainwright. The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Mic*. 2003; 39 (1): 17-22.
- [72]- H.K. Ledford, B.L. Chin, K.K. Niyogi. Acclimation to singlet oxygen stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell*. 2007; 6 (6): 919-930.
- [73]- N. Gandra, A.T. Frank, O.L. Gendre, N. Sawwan, D. Aebisher, J.F. Liebman, K.N. Houk, A. Greer, R. Gao. Possible singlet oxygen generation from the photolysis of indigo dyes in methanol, DMSO, water, and ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate. *Tetrahedron*. 2006; 62 (46): 10771-10776.
- [74]- M. Wainwright, H. Mohr, W.H. Walker. Phenothiazinium derivatives for pathogen inactivation in blood products. *J Photochem Photobiol B*. 2007; 86 (1): 45-58.
- [75]- H. Tajalli, A. Ghanadzadeh Gilani, M.S. Zakerhamidi, P. Tajalli. The photophysical properties of Nile red and Nile blue in ordered anisotropic media. *Dyes Pigments*. 2008; 78 (1): 15-24.
- [76]- S.J. Isak, E.M. Eyring. Fluorescence quantum yield of cresyl violet in methanol and water as a function of concentration. *J Phys Chem*. 1992; 96 (4): 1738-1742.
- [77]- C.B. Nielsen, M. Johnsen, J. Arnbjerg, M. Pittelkow, S.P. McIlroy, P.R. Ogilby, M. Jørgensen. Synthesis and characterization of water-soluble phenylene-vinylene-based singlet oxygen sensitizers for two-photon excitation. *J Org Chem*. 2005; 70 (18): 7065-7079.



CAPÍTULO 5

INACTIVACIÓN FOTODINÁMICA



ÍNDICE CAPÍTULO 5

5.1- INTRODUCCIÓN	215
5.1.1- Generalidades	215
5.1.2- Inactivación Fotodinámica	217
5.1.2.1- Generalidades	217
5.1.2.2- Fotosensibilizadores	219
5.1.2.3- Sitios de acción y desarrollo de resistencia	221
5.1.2.4- Susceptibilidad al tratamiento	222
5.1.2.5- Aplicaciones actuales	223
5.1.2.5.1- Aplicaciones en cavidad oral	223
5.1.2.5.2- Infecciones cutáneas	224
5.1.2.5.3- Fibrosis quística	224
5.1.2.5.4- Herpes simplex	224
5.2- OBJETIVOS	225
5.3- MATERIALES Y MÉTODOS	225
5.3.1- Materiales	225
5.3.2- Concentración Inhibitoria Mínima	226
5.3.3- Inactivación Fotodinámica en Buffer Fosfato Salino	228
5.4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	229
5.4.1- Concentración Inhibitoria Mínima	229
5.4.2- Inactivación Fotodinámica en Buffer Fosfato Salino	233

5.4.2.1- <i>Inactivación Fotodinámica de Staphylococcus aureus ATCC 25923</i>	233
5.4.2.1.1- <i>Efecto de la concentración de Fotosensibilizador y tiempo de irradiación</i>	233
5.4.2.1.2- <i>Efecto de la densidad bacteriana</i>	237
5.4.2.2- <i>Inactivación Fotodinámica de Staphylococcus aureus resistente a meticilina</i>	238
5.4.2.3- <i>Inactivación Fotodinámica de Escherichia coli ATCC 25922</i> .	243
5.5- CONCLUSIONES	245
Agradecimientos	246
5.6- BIBLIOGRAFÍA	246

5.1- INTRODUCCIÓN

5.1.1- Generalidades

La administración de fármacos para el tratamiento de numerosas patologías infecciosas causadas por diversos microorganismos, representa uno de los avances más revolucionarios realizados en la medicina científica.^{1,2} Sin embargo, los microorganismos han desarrollado una importante variedad de mecanismos que aumentan la resistencia a los fármacos antimicrobianos. Estos mecanismos comprenden, entre ellos, la inactivación enzimática del fármaco, la modificación de la molécula blanco, la restricción de la entrada a la célula y su expulsión antes que actúe.^{1,3-5} Los microorganismos se multiplican muy rápidamente y una mutación que le permite sobrevivir en presencia de un fármaco, pronto se convierte en predominante en la población.^{1,3,6}

Los antimicrobianos han transformado la práctica de la medicina impactando en la vida de innumerables pacientes, no obstante, la morbilidad y mortalidad asociadas a las patologías infecciosas sigue siendo elevada. En consecuencia, las enfermedades emergentes y el desarrollo de resistencia a los fármacos por parte de bacterias y hongos, es motivo de grave preocupación actual.^{4,6}

El uso extensivo e inadecuado de antimicrobianos condujo gradualmente a la aparición de resistencia generalizada, representando una grave amenaza para el tratamiento de una amplia gama de infecciones.⁴

Actualmente, las patologías infecciosas, son la segunda causa de muerte más importante a nivel mundial, ya que producen el deceso de 17 millones de personas cada año. La aparición de nuevas patologías infecciosas y el resurgimiento de enfermedades que anteriormente se consideraban bajo control, conducen a numerosas muertes anuales en todo el mundo.⁶

S. aureus es un microorganismo Gram positivo y uno de los principales agentes en infecciones nosocomiales que coloniza piel humana, fosas nasales y superficies de las mucosas (**Figura 5.1.A**).⁷⁻⁹ Esta bacteria es un patógeno oportunista capaz

de invadir y multiplicarse en diversos tejidos y es considerado uno de los patógenos humanos más frecuentes que provoca una amplia gama de enfermedades, tales como infecciones en heridas, artritis, abscesos profundos, sepsis, neumonía, osteomielitis, meningitis y endocarditis. Este microorganismo ha incrementado su capacidad de resistencia frente a diversos antibióticos como tetraciclina, eritromicina, penicilina, metilicina y vancomicina.^{7,9,10}

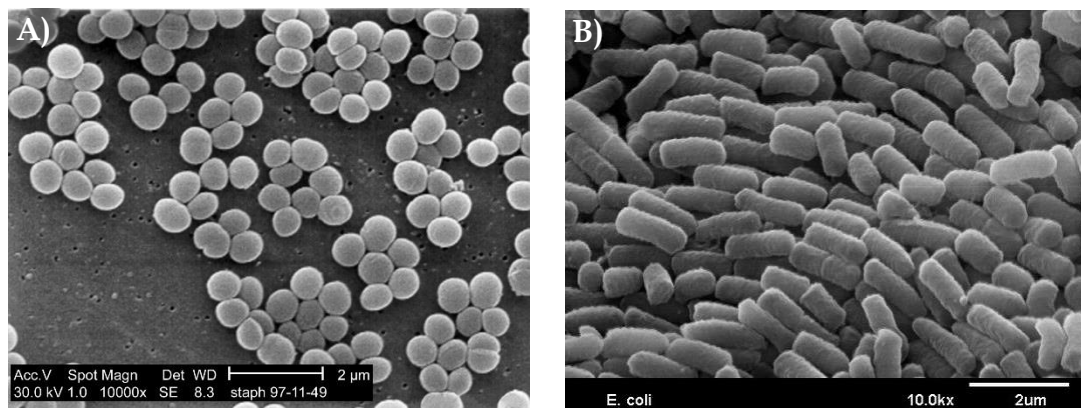


Figura 5.1: Microfotografía electrónica de barrido. **A)** *Staphylococcus aureus**; **B)** *Escherichia coli***.

El primer caso de *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM; *Methicillin-resistant S. aureus*, MRSA) se informó en 1961 y desde entonces la problemática de estas infecciones ha crecido rápidamente. En esta población, se alteró las proteínas de unión a penicilina, por lo cual, presenta una afinidad reducida a la penicilina y otros β -lactámicos. SARM se transmite fácilmente entre los pacientes, lo cual se plantea como un grave problema, ya que las infecciones causadas por cepas

*Imagen de *Staphylococcus aureus*. Extraída de https://microbitos.wordpress.com/2011/08/03/staphylococcus-aureus-epidermidis-saprophyticus/staphylococcus_aureus_01-2/.

**Imagen de *Escherichia coli*. Extraída de <http://microvisionlabs.com/gallery/sem-images/>.

resistentes suelen ser difíciles de tratar. La multirresistencia de *S. aureus* lo convierte en una de las especies más relevantes asociada a infecciones en humanos, que actualmente causa gran preocupación.^{9,11}

E. coli es un bacilo Gram negativo que comprende en su mayoría cepas inofensivas (**Figura 5.1.B**).¹² Sin embargo, algunas de ellas pueden provocar patologías intestinales y extra-intestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, meningitis, peritonitis, septicemia y neumonía.^{12,13} Usualmente sigue una estrategia común para la infección, basada en la adherencia y colonización de las células epiteliales, la evasión de sus defensas y finalmente la multiplicación y daños en el huésped.¹²

La rápida adquisición de resistencia a los antibióticos por parte de bacterias y el tiempo invertido en el desarrollo de nuevos fármacos, ha motivado la investigación de métodos alternativos para afrontar las infecciones bacterianas.^{5,14} En este contexto, se desarrolló una amplia investigación para el tratamiento de patógenos resistentes a múltiples fármacos, como consecuencia de la urgente necesidad de métodos novedosos, convenientes y que no generen resistencia para enfrentar la lucha contra las infecciones microbianas.^{5,10,11}

Numerosos trabajos científicos han demostrado que las bacterias patógenas resistentes al tratamiento con antibióticos convencionales, pueden ser destruidas con éxito empleando la Terapia Fotodinámica Antimicrobiana (TFDA), también conocida como IFD.^{7,15-20}

5.1.2- Inactivación Fotodinámica

5.1.2.1- Generalidades

Considerando los recientes logros de la investigación en TFD y justificada por la severa amenaza para la salud que representa la resistencia a los antimicrobianos, la IFD se ha introducido como un enfoque prometedor y revolucionario para destruir microorganismos. Numerosas investigaciones han demostrado que es eficaz contra bacterias, virus, hongos, parásitos y protozoos.^{11,19,21-23}

La combinación de un fármaco y luz para destruir microorganismos se conoce desde hace más de 100 años, pero este fenómeno se comenzó a estudiar en profundidad y de manera intensa como consecuencia de la búsqueda de nuevos tratamientos para bacterias resistentes a antibióticos, postulando a la IFD como el descubrimiento de una modalidad antimicrobiana alternativa.^{20,21,24,25}

El enfoque de la IFD se basa en el concepto de la TFD, el cual se sustenta en un compuesto conocido como FS que combinado con luz de una longitud de onda específica en presencia de oxígeno molecular, es capaz de generar ERO.^{11,14,20,24,26} Se considera que son dos los mecanismos oxidativos implicados en la destrucción celular. El mecanismo Tipo I involucra reacciones de transferencia de electrones y átomos de hidrógeno desde el estado triplete del FS con la participación de un sustrato, para producir iones radicales. La vía Tipo II implica la transferencia de energía a partir del FS en estado triplete, al oxígeno molecular, para producir $^1\text{O}_2$.^{11,19,20} Ambos procesos conducen a una elevada cantidad de ERO altamente tóxicas, que produce un desbalance en los sistemas de defensas antioxidantes y dañan los componentes esenciales de la célula, afectando la integridad y la función de membranas, ácidos nucleicos y enzimas. Esto puede alterar de modo irreversible los componentes vitales o modificar las actividades metabólicas, produciendo como consecuencia un daño oxidativo letal, lo que podría resultar en la muerte microbiana.^{10,11,14,19,20,26}

La ausencia de nuevas familias de antimicrobianos, sumado a la propagación de bacterias y hongos resistentes a múltiples fármacos, ha impulsado la investigación de esta alternativa terapéutica. La IFD se considera un desarrollo novedoso, conveniente y un método de bajo costo para producir la muerte de microorganismos.^{14,21} Presenta numerosas características favorables para el tratamiento de infecciones causadas por patógenos microbianos, destacándose su amplio espectro de acción y la destrucción eficiente de cepas multiresistentes a antibióticos.^{24,27} Hasta el momento, no existen reportes que describan el desarrollo de mecanismos de resistencia, como consecuencia del modo de acción y tipo de dianas bioquímicas, ya que es un proceso multi-objetivo.^{11,19}

La IFD es un área de creciente interés y en la actualidad las investigaciones están direccionadas principalmente al desarrollo de FS altamente eficientes y compatibles en la clínica, como así también, al estudio de nuevas estrategias de vehiculización de los mismos.^{20,24,25}

5.1.2.2- Fotosensibilizadores

Los FS son usualmente moléculas orgánicas aromáticas que consisten en sistemas de dobles enlaces conjugados, pudiendo ser consideradas como un cromóforo central con cadenas laterales auxiliares (auxocromos) responsables de la mayor deslocalización electrónica, lo que determina su espectro de absorción.^{18,24} Debido a la extensa deslocalización electrónica, los FS tienden a presentar un color muy profundo, evidenciando grandes bandas de absorción en la zona roja del espectro electromagnético.²⁴

La molécula de un FS posee una configuración electrónica estable con los electrones más energéticos en el orbital molecular ocupado más alto (HOMO). Luego de la absorción de un fotón de luz de longitud de onda específica, de acuerdo con su espectro de absorción, un electrón del HOMO es excitado al orbital molecular desocupado más bajo (LUMO), causando que el FS alcance su estado singlete excitado, el cual es inestable y presenta una vida corta. En este estado, pueden ocurrir rápidamente diversos procesos, tales como fluorescencia y conversión interna, sin embargo el más importante de ellos para la IFD es la inversión del spin del electrón excitado, conocido como cruce entre sistemas al estado triplete del FS. Este estado, es menos energético que el estado singlete excitado y posee un tiempo de vida considerablemente más largo, ya que no puede decaer inmediatamente, debido a que ambos electrones tendrían idénticos números cuánticos, violando así el Principio de Exclusión de Pauli. El mayor tiempo de vida posibilita que el FS participe en reacciones químicas, lo que es poco probable desde el estado singlete excitado.^{24,27}

Un FS exitoso para IFD debe poseer una carga positiva, ya que la superficie de las células bacterianas exhibe carga negativa debido a la composición de la pared

celular. En bacterias Gram negativas, los compuestos hidrofílicos (menores a 600-700 Da) pueden difundir únicamente a través de las porinas de la membrana externa, las cuales actúan como una barrera de permeabilidad muy eficaz, razón por la cual las bacterias Gram positivas son más susceptibles a la destrucción que las Gram negativas. Los compuestos FS que no difunden a través de los canales de porina, solamente generan ERO en la región extracelular de las bacterias Gram negativas.²¹ Otra característica importante acerca de los FS antimicrobianos que poseen carga positiva, se refiere a su selectividad frente a las células microbianas en comparación con las células eucariotas. Se informó que las moléculas catiónicas ingresan más rápidamente a las bacterias que a las células eucariotas, por lo que la irradiación con posterioridad a la administración del FS, minimizará el daño causado a los tejidos del huésped.²¹

La TFD aplicada a tumores sólidos, considera que la profundidad de penetración efectiva de la radiación de excitación depende fuertemente de la interferencia de absorción de los principales cromóforos tisulares, entre ellos, la hemoglobina y la melanina, como así también las moléculas de agua. Es por esto, que las radiaciones que son absorbidas por los principales tejidos cromóforos deben evitarse para la excitación eficiente de los FS. El espectro de absorción de estas moléculas, define la ventana terapéutica para la TFD en el tejido, la cual cubre el intervalo de longitudes de onda de 600 a 850 nm. El límite superior de esta ventana lo establece la energía mínima requerida para una producción eficiente de $^1\text{O}_2$. Siendo que la composición de los cromóforos tisulares es diferente en microorganismos, el límite inferior de longitudes de onda de la ventana terapéutica definida para las aplicaciones de TFD, no se aplica necesariamente a los FS empleados en IFD.²¹

Los primeros FS antimicrobianos clínicamente evaluados en seres humanos corresponden a compuestos de la Familia de las Tiazinas, MB, *New Methylene Blue* y *Toluidine Blue O*. Aunque se ha reportado una amplia gama de FS para IFD (porfirinas, clorinas, bacterioclorinas, ftalocianinas, fullerenos, psoralenos y xantenos halogenados), es evidente que las estructuras óptimas para la

destrucción de células procariotas pueden ser sutilmente diferentes de las empleadas en la TFD de células eucariotas.^{18,24}

Actualmente, numerosos derivados se están desarrollando en la comunidad de investigación fotodinámica, con el objetivo de ampliar el campo de las aplicaciones con enfoques prometedores.²¹

5.1.2.3- Sitios de acción y desarrollo de resistencia

El mecanismo de acción fotodinámico se describe como multifactorial y no específico, ya que las especies oxidantes generadas por la excitación del FS inducen fotodaño en múltiples blancos celulares. La IFD produce daños principalmente en la pared y membrana citoplasmática, los cuales implican la liberación de contenidos celulares o inactivación de los sistemas de transporte de membrana, enzimas u otras proteínas. Además, la peroxidación lipídica conduce a la lisis de las membranas celulares, que finalmente contribuye a la muerte microbiana.^{11,24}

Siendo que los principales blancos celulares de los FS son las estructuras de la pared celular, no es necesario que los compuestos ingresen a la célula. En general, se considera que la adhesión específica y adecuada de los FS a estas estructuras, es suficiente para la destrucción de las células blanco luego de la irradiación.^{11,19} De este modo, las células presentan bajas probabilidades de desarrollar algún tipo de mecanismo de resistencia a esta terapia.^{11,19,23}

En este contexto, numerosos estudios han evaluado el posible desarrollo de resistencia a la IFD empleando diversos FS, tanto en cepas sensibles como resistentes de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* y *Vibrio fischeri*. Los microorganismos evaluados se expusieron a tratamientos repetitivos de IFD, ya que las colonias supervivientes se ensayaron en nuevos estudios, sin observar diferencias significativas en la tasa de muerte celular.^{11,24} Además, hasta el presente no hay estudios que informen diferencias significativas en la destrucción evidenciada entre cepas sensibles y resistentes a antimicrobianos convencionales.²⁰

5.1.2.4- Susceptibilidad al tratamiento

Diversos estudios han demostrado que las bacterias Gram positivas son más susceptibles a la IFD en comparación con las Gram negativas. Las bacterias Gram positivas presentan una membrana citoplasmática rodeada por una capa relativamente porosa de peptidoglicanos y ácido lipoteicoico, lo que permite que el FS pueda atravesarla (**Figura 5.2.A**).^{10,21,28} Ensayos *in vitro* demostraron que estas bacterias son susceptibles a la acción fotosensibilizadora de una gran variedad de FS.^{7,15,26,29}

Por su parte, las bacterias Gram negativas presentan una membrana citoplasmática interna rodeada por un espacio periplásmico conteniendo peptidoglicanos (**Figura 5.2.B**).^{10,21,28} Estos microorganismos están recubiertos por una membrana externa rica en lipopolisacáridos, lo que le confiere una fuerte carga negativa, dificultando la permeabilidad de compuestos neutros o aniónicos.²⁰

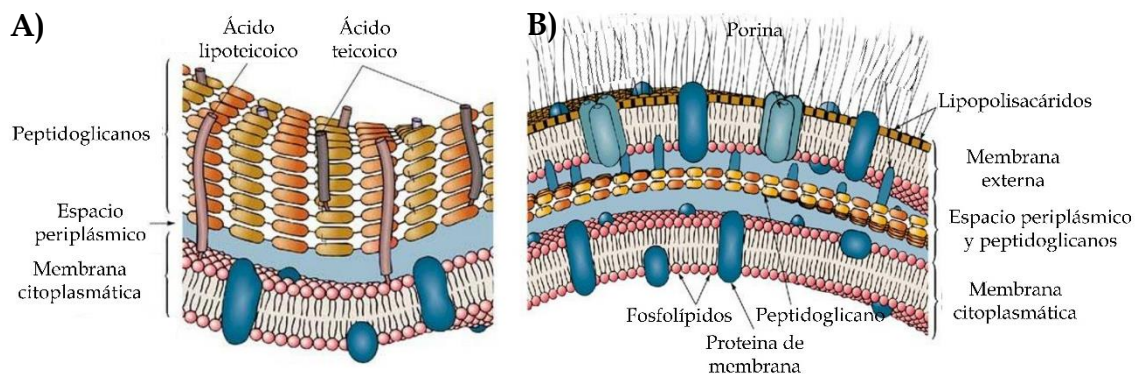


Figura 5.2: Esquema de la estructura bacteriana de la pared celular*. **A)** Bacteria Gram positiva, **B)** Bacteria Gram negativa.

*Imagen de estructura bacteriana de la pared celular. Extraída de <https://chemtips.wordpress.com/2012/10/11/breaching-the-wall/>

Es importante destacar que los FS catiónicos promueven una interacción electrostática con las cargas negativas en la superficie exterior, aumentando la eficiencia de la actividad fotodinámica.^{15,28,29} Además, es factible producir la muerte celular de las bacterias Gram negativas mediante el incremento de la permeabilidad de la membrana externa empleando diferentes productos químicos o agentes biológicos.^{10,20,21}

5.1.2.5- Aplicaciones actuales

Las infecciones localizadas en la piel, cavidad oral, heridas, como así también en el oído medio, son especialmente adecuadas para el tratamiento empleando IFD, ya que son accesibles para la aplicación tópica del FS y la irradiación.^{21,24}

Los resultados obtenidos de los estudios *in vitro* demostraron ser prometedores en una amplia variedad de especies microbianas, por lo cual numerosos estudios evaluaron *in vivo* una serie de aplicaciones clínicas de la IFD.²⁴ El uso clínico requiere de métodos eficaces y adecuados de administración de luz, como así también que el FS se encuentre disponible en el sitio de acción. Factores tales como la aceptabilidad del paciente, las propiedades fisicoquímicas y la dosis del FS impactarán en el éxito del tratamiento.³⁰

5.1.2.5.1- Aplicaciones en cavidad oral

La IFD ha sido propuesta para numerosas aplicaciones en cavidad oral como consecuencia de la accesibilidad y la complejidad de la microflora, lo que determina un microambiente que dificulta la aplicación de nuevos antimicrobianos.²⁴ Diversos estudios han demostrado que la IFD es eficaz frente a los microorganismos orales relacionados con caries dentales, ya que produce la destrucción de una cantidad significativa de *Staphylococcus mutans* en células planctónicas o en biofilms.¹⁴

5.1.2.5.2- Infecciones cutáneas

La IFD mediante la aplicación de compuestos pertenecientes a la Familia de las Tiazinas, ha sido ensayada en ratones para la profilaxis y el tratamiento de infecciones cutáneas causadas por *C. albicans*. Los estudios *in vitro* evidenciaron una buena respuesta empleando como FS a MB y *Toluidine Blue O*, en tanto que los ensayos *in vivo* mostraron una reducción significativa de *C. albicans* en la herida cutánea superficial de los ratones. También se evaluó un modelo murino *in vivo* con candidiasis resistente a los azoles, que se trató administrando vía tópica MB combinado con luz roja, lo cual produjo la destrucción total de *C. albicans* e impidió la aparición de resistencia.²⁴

Además, la IFD se presentó como un tratamiento prometedor para infecciones micóticas superficiales de la piel causadas por dermatofitos.²⁴

5.1.2.5.3- Fibrosis quística

Existe una clara necesidad de tratamientos antimicrobianos alternativos para las infecciones pulmonares crónicas causadas por bacterias resistentes a los antibióticos convencionales, en pacientes diagnosticados con fibrosis quística. Los microorganismos en estado planctónico y en biofilms son altamente susceptibles a la IFD empleando MB, cuando la radiación y el FS pueden ser dirigidos con éxito al sitio de acción. Sin embargo, antes de ser aplicado en la clínica, factores tales como la dosis total de luz y el tiempo de irradiación requieren una mayor optimización.³⁰

5.1.2.5.4- Herpes simplex

La IFD se ha empleado en el tratamiento del herpes simplex tipo 1 que produce el denominado herpes labial recurrente, para reducir el título viral en la fase de vesícula. Esta técnica ha demostrado ser sencilla, no traumática en el tratamiento de lesiones orales y bien tolerada por los pacientes.³¹

Los ensayos desarrollados evidenciaron una reducción significativa de la persistencia de las erupciones herpéticas y del intervalo de recurrencia, detectando una disminución del dolor sin efectos secundarios. Aunque estos resultados indican un potencial uso beneficioso de los láseres, la literatura aún carece de ensayos clínicos controlados doble ciego que verifiquen estos efectos.³¹

5.2- OBJETIVOS

El desarrollo de resistencia de bacterias y hongos a los antimicrobianos actualmente empleados en terapéutica, motiva la necesidad de nuevos enfoques para su tratamiento. En este contexto, la acción fotoantimicrobiana de ciertos compuestos FS, surge como una nueva alternativa para tratar diversas infecciones como consecuencia de la eficacia y menor probabilidad de inducir resistencia. Ante la necesidad del desarrollo de esta metodología terapéutica, se evaluó la IFD mediada por el nuevo derivado NRBr de una cepa bacteriana de *S. aureus*, SARM y *E. coli*. El FS precursor se estudió simultáneamente a fines comparativos y con el objetivo de profundizar y ampliar el conocimiento relativo al mismo. Ambos compuestos presentaron óptimas propiedades en relación a pureza, solubilidad acuosa y producción de $^1\text{O}_2$. En este contexto, se determinó el efecto de la concentración de FS, densidad celular y diversos tiempos de irradiación.

5.3- MATERIALES Y MÉTODOS

5.3.1- Materiales

Neutral Red chloride (3-amino-7-dimetilamino-2-metil fenazina hidrocloreuro; N7005-5G; lote N° 017K1193) se adquirió a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y se empleó sin previa purificación, confirmando su pureza > 98% por RP-HPLC. El

compuesto NRBr se obtuvo mediante la metodología previamente descrita en la **Sección 2.3.4.3: "Síntesis y caracterización de derivados de Azinas"**.

Las cepas bacterianas evaluadas fueron *S. aureus* ATCC* 25923 y *E. coli* ATCC 25922. Además se evaluó una cepa clínica de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM 61), la cual también es resistente a fluoroquinolonas. Todas las cepas bacterianas se mantuvieron criopreservadas en solución acuosa de glicerol al 10% a (-20°C) y se realizaron subcultivos semanales en agar Müeller-Hinton (Britania).

Se empleó agar Müeller-Hinton (Britania), caldo Müeller-Hinton (Britania) (**Anexo 8.1**) y caldo Nutritivo (Britania) (**Anexo 8.2**) preparados según las instrucciones impartidas por el fabricante.

En los ensayos de IFD se utilizó *Buffer Fosfato Salino (Phosphate Buffered Saline, PBS)* 10 mM de pH=7,4; preparado según **Anexo 8.3**.

Los ensayos iluminados se desarrollaron irradiando con una lámpara LED Parathom® (5w - OSRAM). La intensidad de irradiación medida con un Tes 1.332 Digital Lux Meter (TES Electrical Electronic Corp.) fue de 8,4 mW/cm² determinada a 5 cm y de 3,4 mW/cm² a 10 cm de distancia.

5.3.2- Concentración Inhibitoria Mínima

La evaluación de ambos FS se realizó adaptando el procedimiento de macrodilución en caldo, descrito en *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*.³² Este procedimiento es usualmente empleado para evaluar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)** de antibióticos.

*Los cultivos pertenecientes a ATCC ("*American Type Culture Collection*") son un material biológico estandarizado de referencia, que cumple con las correspondientes pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares.

**Menor concentración de fármaco que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo en medio de cultivo, con posterioridad a la incubación.

La solución *stock* de FS se preparó empleando una mezcla de *N,N*-dimetilformamida (DMF): agua estéril (1:9 v/v), de acuerdo a lo determinado previamente en ensayos de solubilidad. A partir de esta solución *stock*, se realizaron diluciones seriadas en caldo Müller-Hinton, siguiendo el esquema propuesto por CLSI.³²

A 1 mL de cada dilución de FS contenido en un tubo de ensayo, se le adicionó 1 mL de inóculo estandarizado. El inóculo se preparó en agua estéril, suspendiendo 4 ó 5 colonias provenientes de un cultivo fresco (*overnight*) en agar Müller-Hinton, ajustando la turbidez a la del estándar 0,5 en la escala de McFarland*. La suspensión estandarizada se diluyó 1:200 en caldo Müller-Hinton a fin de obtener un inóculo final en el ensayo de $\sim 10^5$ UFC/mL, que corresponde al empleado por el CLSI para la evaluación de la eficacia antimicrobiana.³²

Los tubos de ensayo se expusieron a distintos tiempos de irradiación con luz visible y posteriormente se incubaron por 18-24 horas a 35 °C. La CIM se definió considerando la ausencia de turbidez a simple vista. Luego de la lectura de la CIM, se transfirió una alícuota a placas de agar Müller-Hinton empleando un ansa calibrada y se incubaron 18-24 horas a 35 °C. Se definió como valor de Concentración Bactericida Mínima (CBM)** a la menor dilución de FS en la cual no se observó desarrollo bacteriano.

Se incluyeron tubos control en todos los ensayos, los cuales se mantuvieron en oscuridad, tanto en presencia del FS (con el objetivo de determinar la ausencia de toxicidad) como en ausencia del mismo (para establecer el efecto tóxico de DMF sobre las cepas bacterianas). También se desarrollaron ensayos en ausencia del FS con irradiación, a fin de determinar el efecto del impacto lumínico sobre los microorganismos. Además, se incluyeron tubos control que permitieron verificar

*Estándar preparado mediante el agregado de 0,5 mL de BaCl_2 0,048 M (1,175% P/V $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 99,5 mL de H_2SO_4 0,36 N (1% V/V). La densidad correcta de la turbidez estándar debe presentar una absorbancia entre 0,08 - 0,1; determinado espectrofotométricamente a 625 nm en una celda con paso óptico de 1 cm.

**Menor concentración de fármaco capaz de producir la muerte bacteriana, con posterioridad a la incubación.

la viabilidad del inóculo, corroborando que el medio de cultivo y las condiciones de incubación fueran adecuados para el desarrollo. Se incluyó un control de caldo de cultivo sin inocular para verificar que la totalidad del proceso se realizó bajo condiciones de esterilidad.

5.3.3- Inactivación Fotodinámica en *Buffer Fosfato Salino*

La metodología general consistió en enfrentar un inóculo estandarizado a diversas concentraciones de FS e irradiación. Posteriormente se extrajeron alícuotas que se diluyeron de manera apropiada y se sembraron en placas de agar Müeller-Hinton. Las mismas, se incubaron por 18-24 horas a 37 °C y se realizó el recuento del número de unidades formadoras de colonias (UFC) en cada placa. La solución *stock* de los FS se preparó en DMF: agua estéril (1:9 v/v) y las posteriores diluciones se realizaron empleando PBS estéril (10 mM, pH=7,4), a fin de obtener soluciones de diferentes concentraciones de FS.

El inóculo se preparó en agua estéril, suspendiendo 4 ó 5 colonias provenientes de un cultivo fresco (*overnight*) en agar Müeller-Hinton, ajustando la turbidez a la del estándar 0,5 en la escala de Mc Farland, para obtener una concentración celular $\sim 5 \times 10^7$ UFC/mL. En determinados experimentos, esta suspensión se diluyó 1:200 empleando PBS para obtener un inóculo $\sim 10^5$ UFC/mL, con la finalidad de evaluar el efecto de la densidad bacteriana.

A 1 mL de cada dilución de FS contenido en un tubo de ensayo, se le adicionó 1 mL de inóculo estandarizado, exponiendo posteriormente los tubos a distintos tiempos de irradiación. Transcurrido el tiempo preestablecido de exposición, alícuotas de 100 μ L se diluyeron en serie (1:10) empleando PBS estéril. Considerando el tiempo de irradiación y la concentración de FS en el tubo evaluado, se realizaron diluciones decimales adicionales, a fin de obtener concentraciones celulares en el intervalo de 10^{-1} - 10^{-5} UFC/mL con respecto a las concentraciones originales y un número adecuado de colonias (30 - 300 colonias/placa). Una alícuota de 100 μ L de cada dilución se distribuyó homogéneamente en placas de agar Müeller-Hinton con espátula de Drigalsky. Las placas se

incubaron durante 18-24 horas a 37 °C y posteriormente se procedió al recuento del número de UFC en cada placa, expresando los resultados como UFC/mL. El resultado se expresó como ≤ 10 UFC/mL, al no detectar UFC en las placas. Este valor corresponde a 1, en la representación gráfica del \log_{10} de bacterias sobrevivientes y se define como el límite de detección de la metodología.^{32,33}

Inmediatamente después de estandarizar el inóculo, se determinó el número de células viables en el tubo control empleando la misma metodología, a fin de determinar el inóculo inicial, denominado inóculo a tiempo cero.

En todos los casos se desarrollaron controles, aplicando la metodología previamente descrita, en ausencia de FS con irradiación y en oscuridad. Además se realizaron controles en presencia de FS en oscuridad por el mismo período. Se realizaron controles adicionales de crecimiento bacteriano, en ausencia tanto de la mezcla DMF: agua estéril (1:9 v/v), como de irradiación y FS.

Los ensayos se realizaron empleando concentraciones de FS inferiores a 200 μ M, considerando que las pruebas preliminares de solubilidad, correspondientes al derivado NRBr, demostraron la precipitación del FS a concentraciones superiores. Todas las experiencias se desarrollaron a una distancia de irradiación de 5 cm.

Los resultados obtenidos se expresaron como la media \pm la desviación estándar de al menos dos experimentos independientes realizados por duplicado. La diferencia entre dos medias se comparó mediante la prueba de la *t* de Student de dos colas y los valores de $P < 0,05$ se consideraron significativos.

5.4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.4.1- Concentración Inhibitoria Mínima

La evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de un nuevo compuesto, usualmente se inicia mediante determinaciones de CIM y CBM.

En particular para compuestos FS, se ha establecido que el grado de IFD depende fuertemente del contenido proteico del entorno, determinando una relación entre la disminución de la actividad fotodinámica y la presencia de proteínas en el medio de cultivo.^{29,34-36} La explicación se sustenta en la unión entre el FS y las proteínas, lo que impacta en la producción de especies citotóxicas, siendo importante destacar que esta situación puede ser revertida mediante la vehiculización de los agentes FS.^{34,35,37} Por su parte, las proteínas presentes en el medio, podrían actuar como atraparoras de ERO, inhibiendo la IFD y produciendo como resultado un efecto protector de los microorganismos. Se ha establecido que la destrucción depende tanto de la concentración, como del tipo de proteínas del medio de cultivo.^{34,35}

Un trabajo científico reportó ausencia de efecto fotodinámico al evaluar derivados de porfirina frente a *Acinetobacter baumannii* empleando un medio de cultivo con alta concentración de proteínas, en tanto que se evidenció una muerte bacteriana significativa en caldo nutritivo, medio con menor concentración de nutrientes orgánicos³⁴ (**Anexo 8.2**). Otro reporte bibliográfico estableció ausencia de IFD al evaluar un compuesto porfirínico frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* en caldo de cultivo, en tanto que se obtuvo muy buena actividad fotoantimicrobiana empleando PBS como medio.³⁵

No obstante, numerosos investigadores han reportado la aplicación de NR en IFD.³⁸⁻⁴³ En particular, determinaron la CBM para este FS frente a *S. aureus* y *E. coli*, informando valores de 12,5 y 15,6 μM respectivamente, en tanto que otros autores reportaron valores de CIM de 54 y 400 μM frente a los mismos microorganismos.^{37,44}

La inconsistencia bibliográfica, motivó el interés por estudiar al FS precursor, NR, considerando relevante la evaluación y comparación con la actividad fotoantimicrobiana del nuevo derivado monobromado.

Ambos FS se evaluaron frente a *S. aureus* ATCC 25923 en caldo Müeller-Hinton, irradiando los tubos de ensayo a una distancia de 10 cm de la lámpara, durante 10 minutos, recibiendo una dosis total de luz de 2,04 J/cm². En este experimento se evaluaron de manera simultánea tres grupos de tubos que contenían diferentes

concentraciones de cada FS (1,56 μM a 100 μM). Una serie de tubos de ensayo se mantuvo como control en oscuridad, otra se irradió, en tanto que la tercera se protegió durante 30 minutos de la luz, con posterioridad al agregado de la suspensión bacteriana. Transcurrido ese tiempo de espera, las muestras se irradiaron durante 10 minutos de manera análoga al grupo de tubos irradiado inicialmente. Este ensayo tiene la finalidad de evaluar si el tiempo de incubación ejerce una acción en la muerte microbiana.

Todos los tubos de ensayo presentaron buen desarrollo, evidenciando visualmente una turbidez comparable con el control positivo, indicando la ausencia de inhibición bacteriana.

Es importante destacar que los tubos de ensayo que contenían FS y se mantuvieron en oscuridad, también evidenciaron turbidez comparable con el control, indicando ausencia de toxicidad de ambos FS frente a *S. aureus* ATCC 25923. Por su parte, los controles en ausencia de FS, irradiados y en oscuridad, también presentaron turbidez comparable con el control positivo, permitiendo descartar que tanto la concentración de DMF empleada en el ensayo o la irradiación impacten en la viabilidad bacteriana.

Debido a la imposibilidad de determinar el valor de CIM en estas condiciones experimentales, se desarrollaron nuevos estudios empleando el reactivo de partida y modificando los parámetros que pudieran afectar la capacidad fotosensibilizadora del compuesto. En la **Tabla 5.1** se resumen las condiciones experimentales en que se realizaron los ensayos.

Se evaluaron mayores dosis de luz, mediante el incremento del tiempo de irradiación, y la disminución de la distancia entre la lámpara y los tubos de ensayo. También se evaluó un inóculo 10 veces menor ($\sim 10^4$ UFC/mL) y se ensayaron mayores concentraciones de NR (25 a 1600 μM). La experiencia empleando altas concentraciones de FS y tiempo de irradiación prolongado, se desarrolló frente a *S. aureus* y *E. coli*, con la finalidad de determinar si la ausencia de actividad podía ser atribuida a la especie bacteriana evaluada. Se ensayaron un número importante de parámetros experimentales y todos los tubos de ensayo presentaron buen desarrollo. Además, la transferencia de una alícuota de cada

tratamiento a medio sólido (agar Müeller-Hinton) también evidenció buen desarrollo, indicando ausencia de muerte bacteriana.

Tabla 5.1: Condiciones experimentales evaluadas para la determinación del valor de Concentración Inhibitoria Mínima para *Neutral Red*.

Cepa	Inóculo (UFC/mL)	Distancia (cm)	Tiempo (min)	Dosis (J/cm ²)	Concentración NR (μM)
<i>S. aureus</i>	~ 10 ⁵	10	10	2,04	1,56 - 100,00
			20	4,08	
			30	6,12	
			40	8,16	
	~ 10 ⁵	5	40	20,16	1,56 - 100,00
			50	25,20	
	~ 10 ⁴	5	40	20,16	1,56 - 100,00
			50	25,20	
	~ 10 ⁵	5	60	30,24	25 - 1600
			60	30,24	
<i>E. coli</i>	~ 10 ⁵	5	60	30,24	25 - 1600

Además, se realizaron ensayos empleando caldo nutritivo, desarrollándolos de manera análoga a las experiencias anteriores, en las que se empleó caldo Müeller-Hinton. Se evaluó el compuesto NR en un amplio intervalo de concentraciones (50 - 800 μM) frente a *S. aureus* ATCC 25923, irradiando las muestras a una distancia de 5 cm durante 60 minutos, recibiendo una dosis total de luz de 30,24 J/cm². Todos los tubos de ensayo evidenciaron turbidez comparable con el control positivo, siendo destacable que a concentraciones elevadas de FS, se evidenció precipitación del mismo, el cual presentó buena solubilidad en los ensayos preliminares sin el inóculo bacteriano. Por lo tanto, en las condiciones ensayadas no se determinó actividad fotodinámica de NR y en consecuencia, se evaluó la IFD empleando PBS como medio, considerando los antecedentes reportados para otros compuestos FS.^{45,46}

5.4.2- Inactivación Fotodinámica en Buffer Fosfato Salino

Se evaluaron numerosos parámetros con el fin de abordar la IFD del nuevo derivado NRBr y su precursor NR. Es importante destacar que ninguno de los controles realizados exhibió variación significativa ($P > 0,05$) en el número de células viables en comparación con el grupo control inicial (inóculo a tiempo cero), por lo que no se observó toxicidad de ambos FS frente a las cepas evaluadas.

5.4.2.1- Inactivación Fotodinámica de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

5.4.2.1.1- Efecto de la concentración de Fotosensibilizador y tiempo de irradiación

Un amplio intervalo de concentraciones de NR y NRBr (5 - 200 μM) se ensayaron frente a un inóculo inicial de $\sim 10^5$ UFC/mL, irradiando con luz visible durante 15 minutos (dosis de luz=7,56 J/cm²).

En la **Figura 5.3** se presenta la viabilidad de *S. aureus* ATCC 25923, en función de la concentración de ambos FS. El compuesto NR (**Figura 5.3.A**) no presentó actividad fotodinámica en las condiciones experimentales ensayadas.

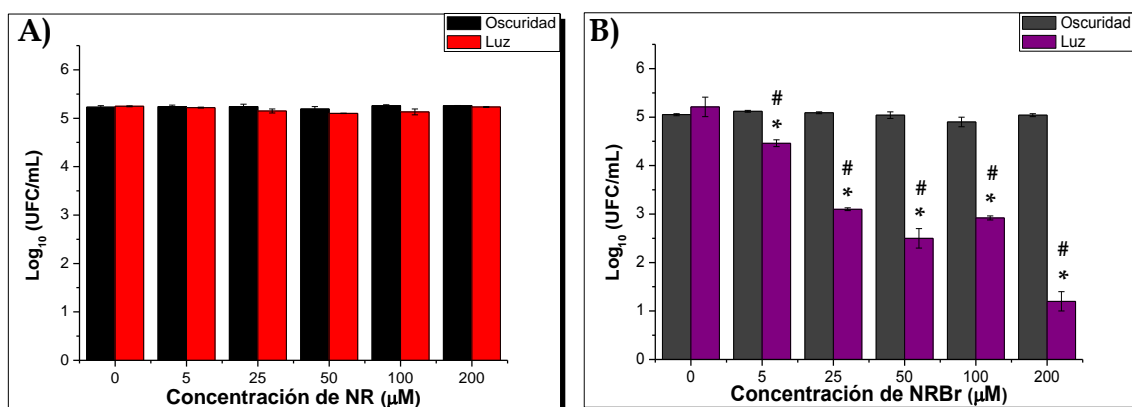


Figura 5.3: Actividad fotodinámica a diferentes concentraciones de FS frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ($\sim 10^5$ UFC/mL), en oscuridad y a 15 minutos de irradiación. **A)** NR; **B)** NRBr. * $P < 0,05$ en comparación con la anterior concentración irradiada. # $P < 0,05$ en comparación con igual concentración de FS en oscuridad.

Por su parte, todas las concentraciones evaluadas de NRBr (**Figura 5.3.B**) produjeron una disminución de la carga microbiana inicial, con posterioridad a los 15 minutos de irradiación. El nuevo derivado NRBr exhibió significativa actividad fotodinámica, dependiente de la concentración. La menor concentración evaluada (5 μM) condujo a una reducción en el recuento de $\sim 1 \log_{10}$, en tanto que al ensayar una concentración de 200 μM se observó una disminución próxima a 4 \log_{10} . La IFD presentada por ambos FS, demostró marcadas diferencias.

Otra experiencia desarrollada, involucró la irradiación de ambos FS durante 30 minutos (dosis de luz=15,12 J/cm²), empleando 5 y 25 μM , las menores concentraciones evaluadas en el ensayo anterior (**Figura 5.4**).

Como puede observarse en la **Figura 5.4.A**, el ensayo a 5 μM de NR evidenció fotoactividad significativa en comparación con el control en oscuridad (disminución $\sim 0,25 \log_{10}$), en tanto que a 25 μM produjo una reducción significativa de $\sim 2 \log_{10}$ de UFC/mL.

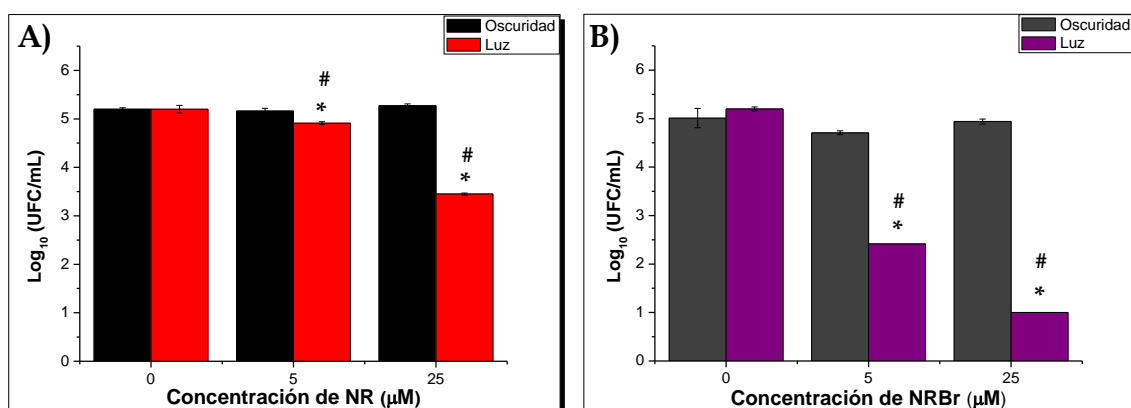


Figura 5.4: Actividad fotodinámica a dos concentraciones de FS frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ($\sim 10^5$ UFC/mL), en oscuridad y a 30 minutos de irradiación. **A)** NR; **B)** NRBr. * $P < 0,05$ en comparación con la anterior concentración irradiada. # $P < 0,05$ en comparación con igual concentración de FS en oscuridad.

Por otra parte, la menor concentración de NRBr (**Figura 5.4.B**) condujo a una importante reducción de la carga inicial (mayor a $2 \log_{10}$ de UFC/mL), y a $25 \mu\text{M}$ no se presentó desarrollo microbiano, considerando erradicación del inóculo. Al comparar la actividad exhibida por ambos FS, a las dos concentraciones ensayadas, el derivado NRBr demostró claramente mayor actividad fotoantimicrobiana, en comparación con la exhibida por el compuesto precursor. Los resultados obtenidos al evaluar 60 minutos de irradiación (dosis de luz= $30,24 \text{ J/cm}^2$), evidenciaron una reducción del recuento de $\sim 1 \log_{10}$ con $5 \mu\text{M}$ de NR, lo que indicó que el reactivo de partida presentó actividad aún a bajas concentraciones (**Figura 5.5.A**). El ensayo a $25 \mu\text{M}$ de este FS produjo un considerable aumento de la muerte celular, sin observar dependencia de la concentración en el intervalo de 25 a $200 \mu\text{M}$. Por lo tanto, las concentraciones ensayadas de NR no condujeron a la destrucción total del microorganismo. Por su parte, los cultivos expuestos a NRBr e irradiados bajo las mismas condiciones experimentales, exhibieron ausencia de bacterias viables en todo el intervalo de concentraciones ensayado (**Figura 5.5.B**). Los resultados obtenidos indicaron que el nuevo derivado monobromado presentó mayor actividad fotoantimicrobiana con respecto al precursor, frente a *S. aureus*, abriendo una perspectiva valiosa para su aplicación en IFD.

El incremento de la fotoactividad evidenciada por NRBr podría estar vinculado con la mayor lipofilidad determinada para este FS, en comparación con el compuesto precursor, lo que incrementaría el grado de incorporación microbiana⁴⁷ (**Sección 4.4.2: "Coeficiente de Partición"**). Además, la constante de disociación ácido base es un parámetro fisicoquímico que presenta un impacto relevante en la actividad biológica de un compuesto. El nuevo FS bromado en el medio evaluado, está presente como una mezcla de la forma neutra y catiónica, presentando una mayor proporción de la especie neutra al compararlo con el FS precursor (**Sección 4.4.1: "Constante de Disociación Ácido-Base"**). Esto permitiría que la forma no ionizada del derivado bromado atraviese fácilmente las diversas membranas biológicas, posibilitando la incorporación y acumulación en el interior celular.^{48,49} Como consecuencia, es posible que la concentración de

NRBr en el interior bacteriano sea mayor que la correspondiente a NR, y suficiente para producir la muerte microbiana en mayor extensión.

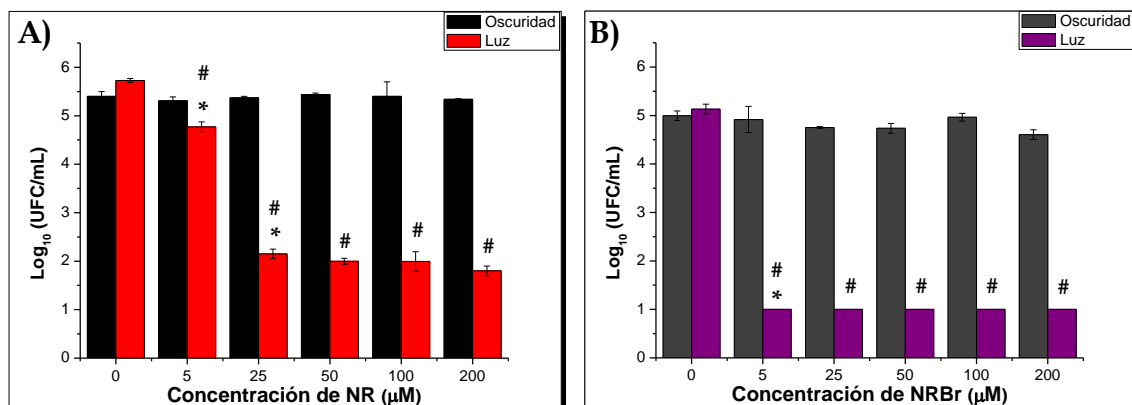


Figura 5.5: Actividad fotodinámica a diferentes concentraciones de FS frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ($\sim 10^5$ UFC/mL), en oscuridad y a 60 minutos de irradiación. **A)** NR; **B)** NRBr. * $P < 0,05$ en comparación con la anterior concentración irradiada. # $P < 0,05$ en comparación con igual concentración de FS en oscuridad.

A partir de los resultados obtenidos, se podría concluir que la sustitución de un átomo pesado en la estructura de NR condujo a un incremento de la actividad frente a la cepa bacteriana, con ausencia de toxicidad en oscuridad.

Cabe destacar, que el mayor efecto exhibido por NR (disminución de $\sim 3,2$ log₁₀ en la sobrevida bacteriana) se observó al tratar el cultivo con una concentración ≥ 25 μM y 60 minutos de irradiación, en tanto que para NRBr se determinó el mismo nivel de reducción de viabilidad al tratar la cepa con una concentración de FS de 25 μM y sólo 30 minutos de irradiación. Considerando el comportamiento exhibido por el nuevo derivado, se seleccionó como tiempo óptimo de ensayo 30 minutos de irradiación, para el desarrollo de los estudios posteriores.

5.4.2.1.2- Efecto de la densidad bacteriana

Existen reportes bibliográficos que indican que el incremento de la densidad celular inicial se correlaciona inversamente con la incorporación y por lo tanto con la muerte celular producida por ciertos agentes FS.^{47,50}

Por tal motivo, se evaluó el efecto de la densidad celular frente a dos inóculos iniciales, $\sim 10^5$ y $\sim 10^7$ UFC/mL. Se ensayaron diversas concentraciones del nuevo derivado NRBr (12,5 - 100 μM) y se irradió durante 30 minutos, con una dosis total de luz de 15,12 J/cm². Cabe destacar que el reactivo de partida no fue expuesto a una mayor densidad bacteriana, ya que no condujo a la erradicación microbiana al enfrentarlo a un inóculo inicial $\sim 10^5$ UFC/mL y 60 minutos de irradiación.

En la **Figura 5.6** se presentan los resultados de la IFD de *S. aureus*, obtenidos al evaluar dos inóculos iniciales de diferente densidad. En ambos casos, se evidenció un incremento significativo de la fotoactividad con el aumento de la concentración de NRBr.

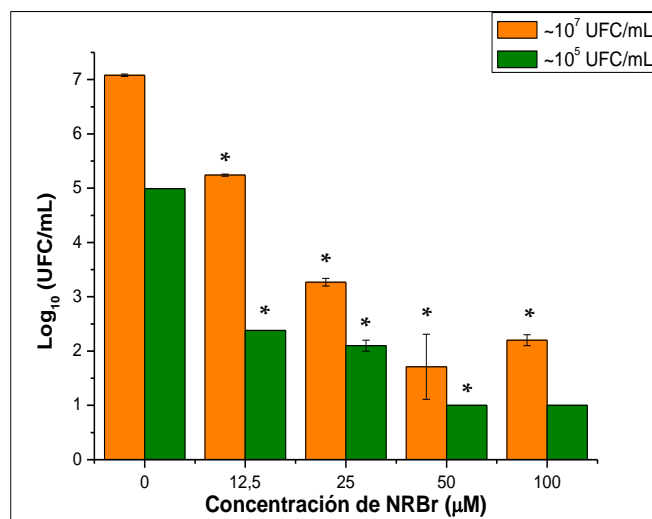


Figura 5.6: Actividad fotodinámica a diferentes concentraciones de NRBr frente a dos inóculos de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, $\sim 10^5$ y $\sim 10^7$ UFC/mL y 30 minutos de irradiación (los controles en oscuridad han sido omitidos). * $P < 0,05$ en comparación con la anterior concentración ensayada correspondiente al mismo inóculo inicial.

El análisis de los resultados obtenidos con el inóculo de $\sim 10^5$ UFC/mL, indicó que el empleo de 50 μ M y 100 μ M de NRBr evidenció una reducción $\sim 4 \log_{10}$ de UFC/mL, sin detectar bacterias viables, lo que equivale a la erradicación del inóculo en estas condiciones experimentales (límite de detección de la técnica).

La evaluación del inóculo de $\sim 10^7$ UFC/mL exhibió una disminución de la carga microbiana a todas las concentraciones de FS ensayadas en comparación con el control, destacando que 50 μ M produjo una reducción de la carga inicial en $\sim 5 \log_{10}$ de UFC/mL.

Por lo tanto, los resultados obtenidos permiten concluir que la destrucción de *S. aureus* empleando NRBr depende de la concentración de FS, alcanzando una reducción bacteriana similar en ambas condiciones experimentales. Dado que en cada experimento se ensayaron diferentes inóculos de partida, el límite de detección se alcanzó sólo con el inóculo de $\sim 10^5$ UFC/mL, en tanto que la evaluación con el inóculo de $\sim 10^7$ UFC/mL, condujo a la recuperación de bacterias supervivientes.

Si bien se ha establecido que la eficacia de otros FS empleados en IFD disminuye con el incremento de la densidad celular, existen diferencias reportadas que han sido atribuidas al grado de unión entre el FS y estructuras celulares. En particular, la ausencia de dependencia entre la fotoactividad y la densidad celular se describió para el compuesto *Rose Bengal* (Familia de los Xantenos) frente a *S. aureus*, atribuyendo este comportamiento al ingreso del FS mediante un proceso de difusión controlada.⁵⁰

5.4.2.2- Inactivación Fotodinámica de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina

Ambos FS se evaluaron frente a la cepa clínica SARM 61, irradiando 30 minutos con luz visible (dosis de luz= 15,12 J/cm²) y empleando un inóculo inicial $\sim 10^7$ UFC/mL.

El análisis de los resultados obtenidos (**Figura 5.7**) permite señalar que las concentraciones ensayadas de NR $\leq 50 \mu$ M, produjeron un recuento similar a lo

controles (reducción $\sim 0,5 \log_{10}$ de UFC/mL), sin determinar diferencias significativas. El reactivo de partida evidenció escasa actividad frente a esta cepa, sin demostrar una respuesta que determine una relación concentración dependiente. Diferencias significativas sólo se observaron con la mayor concentración evaluada, 100 μM . (**Figura 5.7.A**).

Por su parte, el nuevo derivado NRBr presentó mayor destrucción de la cepa evaluada que su precursor, destacando una disminución de $\sim 2,5 \log_{10}$ UFC/mL con la menor concentración ensayada (12,5 μM). La mayor actividad se observó a una concentración de 50 μM , determinando una reducción de $\sim 3,7 \log_{10}$ UFC/mL, respecto del inóculo inicial (**Figura 5.7.B**). Este FS produjo una importante disminución de la carga microbiana a todas las concentraciones evaluadas, mostrando un marcado efecto concentración dependiente hasta 50 μM . Cabe destacar, que el incremento de la concentración de NRBr (100 μM) no evidenció un aumento en la IFD, observando diferencias significativas en los resultados obtenidos para las concentraciones de 50 μM y 100 μM de FS.

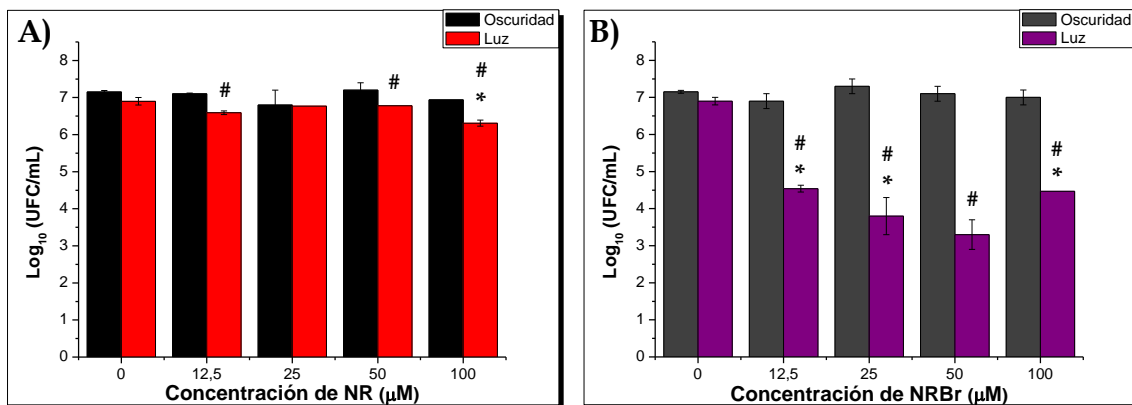


Figura 5.7: Actividad fotodinámica a diferentes concentraciones de FS frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina ($\sim 10^7$ UFC/mL), en oscuridad y a 30 minutos de irradiación. **A)** NR; **B)** NRBr. * $P < 0,05$ en comparación con la anterior concentración irradiada. # $P < 0,05$ en comparación con igual concentración de FS en oscuridad.

El comportamiento exhibido por ambos FS frente a SARM 61, se comparó con la actividad que evidenciaron frente a la cepa de *S. aureus* ATCC, en las mismas condiciones experimentales relativas a densidad bacteriana, tiempo de irradiación y concentración de FS (**Figura 5.8**). Los resultados obtenidos con el nuevo derivado demostraron mayor actividad frente a *S. aureus* ATCC 25923 en comparación con la cepa clínica SARM 61. El empleo de 25 μM y 50 μM de NRBr condujo a una reducción de 4,2 y 5,0 \log_{10} , respectivamente, frente a *S. aureus* ATCC 25923, en tanto que las mismas concentraciones produjeron una reducción de 3,3 y 3,7 \log_{10} frente a SARM 61. Por su parte, el reactivo de partida evidenció escasa actividad frente a la cepa ATCC.

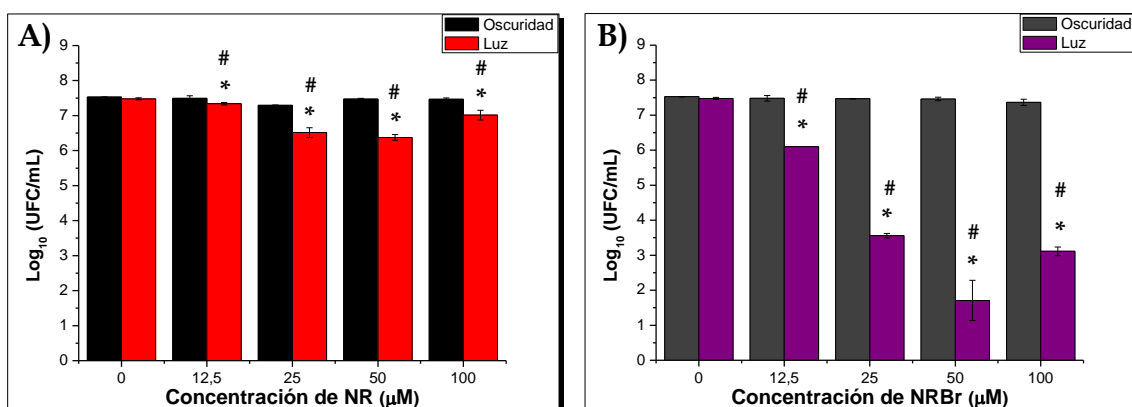


Figura 5.8: Actividad fotodinámica a diferentes concentraciones de FS frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ($\sim 10^7$ UFC/mL), en oscuridad y a 30 minutos de irradiación. **A)** NR; **B)** NRBr. * $P < 0,05$ en comparación con la anterior concentración irradiada. # $P < 0,05$ en comparación con igual concentración de FS en oscuridad.

Los resultados disponibles en bibliografía relativos a FS relacionados estructuralmente a los evaluados en este estudio, no permiten establecer una conclusión al comparar la eficacia de la actividad frente a una cepa sensible y resistente a la meticilina. El comportamiento exhibido por NRBr frente a ambas

cepas, demostró ser similar al reportado para *Toluidine Blue O* (Familia de las Tiazinas) frente a *S. aureus* sensible y resistente a los antimicrobianos. Sin embargo, otros investigadores en un trabajo previo señalan resultados discordantes para el mismo FS.^{15,16}

Es importante destacar que el compuesto NRBr evidenció una respuesta concentración dependiente frente a ambas cepas evaluadas, siendo 50 μM la concentración más activa. La mayor concentración ensayada, 100 μM , exhibió una reducción significativa de la IFD frente a ambas cepas al evaluar una densidad celular $\sim 10^7$ UFC/mL (Figura 5.7.B y Figura 5.8.B). El comportamiento observado, se evaluó mediante el desarrollo de experimentos adicionales considerando ambos FS a concentraciones elevadas, 50 μM , 100 μM y 200 μM (Figura 5.9).

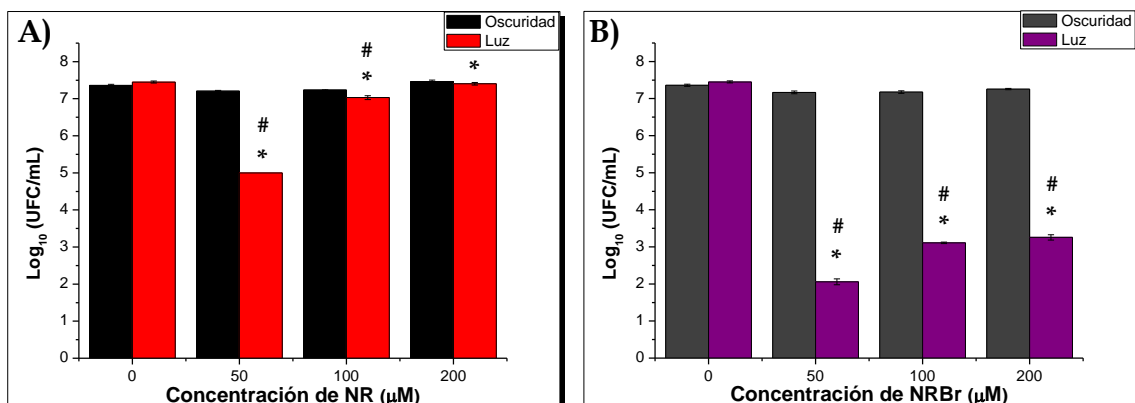


Figura 5.9: Actividad fotodinámica a diferentes concentraciones de FS frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ($\sim 10^7$ UFC/mL), en oscuridad y a 30 minutos de irradiación. **A)** NR; **B)** NRBr. * $P < 0,05$ en comparación con la anterior concentración irradiada. # $P < 0,05$ en comparación con igual concentración de FS en oscuridad.

El análisis del reactivo de partida evidenció significativa actividad al emplear 50 μM , en tanto que las concentraciones 100 y 200 μM se mostraron prácticamente

inactivas (**Figura 5.9.A**). Por su parte, NRBr fue considerablemente más eficaz que NR y al igual que éste, 50 μM se presentó como la concentración más activa de FS, destacando que la actividad evidenciada a 100 μM y 200 μM de NRBr presentó una tendencia similar (**Figura 5.9.B**).

Resultados semejantes a los obtenidos en esta evaluación, fueron reportados por otros autores al ensayar MB y *Toluidine Blue O* (Familia de las Tiazinas), señalando una reducción de la IFD a concentraciones elevadas de los FS. Este comportamiento se atribuyó a un marcado efecto de agregación.⁵¹

Además, otros autores han señalado un incremento del estado de agregación de ambos agentes FS, inducido por el aumento del tamaño del inóculo bacteriano.⁵² Por lo tanto, los antecedentes bibliográficos y los resultados obtenidos a concentraciones elevadas de FS frente a un inóculo inicial $\sim 10^7$ UFC/mL, permiten postular que la reducción significativa de la IFD observada en las experiencias desarrolladas en el marco de este trabajo de Tesis Doctoral, podría atribuirse al efecto de agregación en estas condiciones experimentales. Los FS ensayados, incrementarían su estado de asociación molecular, conduciendo a la formación de agregados mayores. Esta interpretación de los resultados se sustenta en que la agregación de los FS impacta en diversas propiedades, modificando la actividad biológica que presentan.^{51,53}

Los compuestos FS empleados, NR y NRBr, demostraron ser activos frente a ambas cepas evaluadas, tanto la sensible como la resistente a la meticilina.

Con relación a la toxicidad de los compuestos que conforman la Familia de las Azinas en células del huésped, es importante destacar que NR se aplica desde hace mucho tiempo en diferentes ensayos para la estimación de la viabilidad celular en diferentes cultivos.^{54,55} Por su parte, diversos estudios han demostrado que FS bromados presentan muy baja toxicidad en células eucariotas, en tanto que derivados bromados de la Familia de las Tiazinas evidenciaron una disminución de la fototoxicidad en células de cultivo, en comparación con el compuesto precursor.⁵⁶⁻⁵⁸ Como consecuencia, estos estudios sugieren que NR y NRBr podrían emplearse como compuestos fotoantimicrobianos en IFD, sin conducir a efectos perjudiciales para las células del huésped.

5.4.2.3- Inactivación Fotodinámica de *Escherichia coli* ATCC 25922

La evaluación de ambos FS frente a un inóculo inicial de $\sim 10^7$ UFC/mL e irradiación durante 30 minutos con luz visible (dosis de luz=15,12 J/cm²), evidenció para ambos FS, que ninguna de las concentraciones ensayadas (25 μ M - 200 μ M) presentó actividad fotoantimicrobiana (**Figura 5.10**).

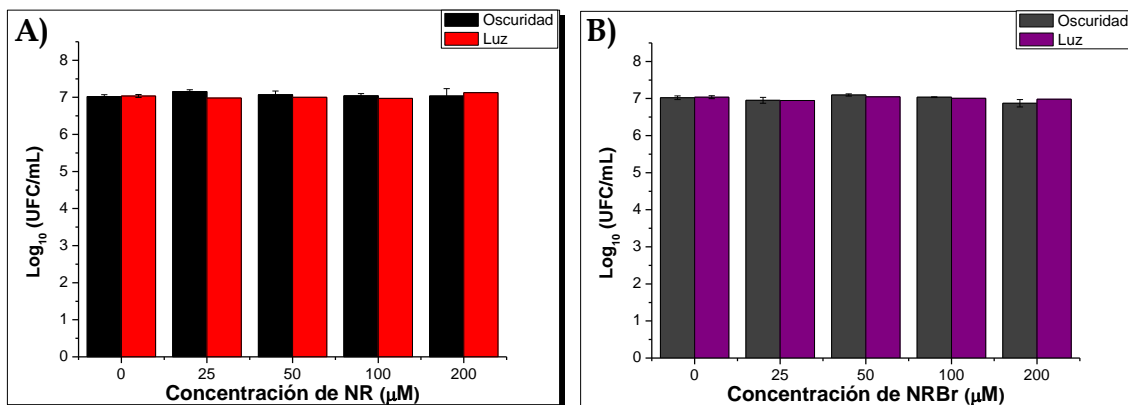


Figura 5.10: Actividad fotodinámica a diferentes concentraciones de FS frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 ($\sim 10^7$ UFC/mL), en oscuridad y a 30 minutos de irradiación. **A)** NR; **B)** NRBr. * $P < 0,05$ en comparación con la anterior concentración irradiada. # $P < 0,05$ en comparación con igual concentración de FS en oscuridad.

El desarrollo de otro estudio en las mismas condiciones experimentales, incrementando el tiempo de irradiación a 60 minutos (dosis de luz = 30,24 J/cm²) se presenta en la **Figura 5.11**. Cabe destacar que se ensayaron sólo las concentraciones más altas de FS (100 μ M y 200 μ M), como consecuencia de la ausencia de actividad fotodinámica, evidenciada en el intervalo de concentraciones estudiado en la experiencia anterior (**Figura 5.10**).

El derivado NRBr no presentó fototoxicidad frente a esta cepa, aún a altas concentraciones y elevadas dosis de luz, evidenciando la ausencia de diferencias significativas con respecto a los controles en oscuridad (**Figura 5.11.B**). Por su parte, si bien ambas concentraciones ensayadas del reactivo de partida

presentaron una disminución significativa de la suspensión celular en relación al control, demostró escasa actividad en las condiciones experimentales ensayadas (Figura 5.11.A).

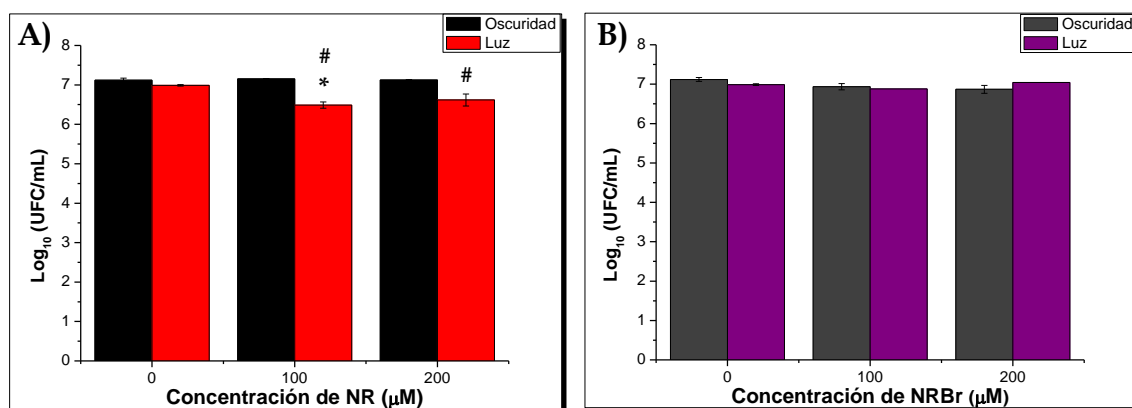


Figura 5.11: Actividad fotodinámica de dos concentraciones de FS frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 ($\sim 10^7$ UFC/mL), en oscuridad y a 60 minutos de irradiación. **A)** NR; **B)** NRBr. * $P < 0,05$ en comparación con la anterior concentración irradiada. # $P < 0,05$ en comparación con igual concentración de FS en oscuridad.

La baja actividad determinada para esta cepa bacteriana en los experimentos desarrollados, es coincidente con numerosos trabajos científicos que establecen que las bacterias Gram negativas son menos susceptibles a esta terapia en comparación con las Gram positivas, como consecuencia de las diferencias estructurales específicas que presentan en las paredes celulares.^{20,21,28,43} Se ha reportado que los FS que poseen una carga positiva, en comparación con los análogos neutros y aniónicos, pueden establecer uniones más eficientes con la membrana externa de las bacterias Gram negativas, a través de interacciones electrostáticas con las cargas negativas presentes. De este modo, las ERO generadas, conducen a un daño fotooxidativo en el interior del microorganismo, y es por esto, que moléculas FS catiónicas se emplean de manera exitosa para la destrucción de estas bacterias.^{7,36}

La mayor actividad evidenciada por NR en comparación con el FS halogenado, podría explicarse considerando que el reactivo de partida presenta un $pK_a=7,0\pm 0,8$; en tanto que el determinado para NRBr es $pK_a=5,8\pm 0,1$ (**Sección 4.4.1: “Constante de Disociación Ácido-Base”**). Por lo tanto, en las condiciones experimentales (PBS pH=7,4) el FS precursor presenta mayor proporción de la especie cargada positivamente, lo cual favorecería las interacciones con las cargas negativas de la membrana de *E. coli*, conduciendo a un incremento de la actividad fotodinámica.

Diversos reportes bibliográficos establecen que la IFD de compuestos FS, se puede incrementar mediante la adición de agentes de permeabilización de la pared celular. Desde un punto de vista clínico, los quelantes de metales, tales como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), son apropiados para provocar una desorganización de las estructuras lipídicas, incrementando la permeabilidad de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Por su parte, la polimixina B es otro agente de permeabilización que ha demostrado incrementar la actividad fotodinámica de un derivado de porfirina frente a *E. coli* y *P. aeruginosa*.^{21,59}

5.5- CONCLUSIONES

El desarrollo de resistencia a agentes antibacterianos y antifúngicos de uso en clínica, ha generado la búsqueda de nuevos tratamientos, siendo la IFD una alternativa terapéutica que emplea luz visible para activar un FS. La IFD presenta la ventaja de una doble selectividad, ya que tanto el FS como la iluminación pueden ser dirigidos, convirtiendo a esta metodología en un tratamiento antimicrobiano de gran interés para infecciones superficiales, en donde se puede irradiar fácilmente.

El nuevo derivado NRBr exhibió un incremento significativo en la acción fotoantimicrobiana frente a *S. aureus*, evidenciando mejoras relevantes en comparación con NR. Este incremento se observó en ambas cepas evaluadas, la sensible y la resistente a la meticilina. Consecuentemente, la bromación de NR

condujo a un incremento de la actividad, destacando la relevancia de los FS bromados y su impacto en la IFD.

El compuesto NR exhibió baja fotoactividad frente a *E. coli* ATCC 25922, en tanto que el nuevo derivado fue inactivo en las condiciones ensayadas. Los resultados obtenidos están en consonancia con los reportados por otros autores que establecen que las cepas Gram negativas son más difíciles de destruir que las Gram positivas.

Los resultados obtenidos sugieren que el nuevo agente FS podría ser prometedor para diversas aplicaciones terapéuticas fotodinámicas. De este modo, el nuevo derivado bromado con mejores propiedades y destacada actividad, podría ser un nuevo líder para las diferentes aplicaciones de esta novedosa alternativa terapéutica.

Agradecimientos

Dra. Verónica Romero y Prof. Dra. Fabiana Alovero. Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

5.6- BIBLIOGRAFÍA

- [1]- W.K. Jorlik, H.P. Willett, D.B. Amos, C.M. Wilfert. Zinsser. Microbiología. 20^{va} edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1996.
- [2]- S.T. Cole. Who will develop new antibacterial agents?. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014; 369 (1645): 20130430-20130437.
- [3]- P.R. Murray, K.S. Rosenthal, M.A. Pfaller. Microbiología Médica. 6ta Edición. Elsevier. Barcelona, España. 2009.
- [4]- J.M.A. Blair, M.A. Webber, A.J. Baylay, D.O. Ogbolu, L.J.V. Piddock. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Rev. Microbiol.* 2015; 13: 42-51.

- [5]- A.J. Huh, Y.J. Kwon. "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J Control Release*. 2011; 156 (2): 128-145.
- [6]- World Health Organization. Antimicrobial resistance. Global Report on Surveillance. 2014.
- [7]- Y. Arenas, S. Monro, G. Shi, A. Mandel, S. McFarland, L. Lilge. Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Ru(II)-based type I/type II photosensitizers. *Photodiagn Photodyn Ther*. 2013; 10 (4): 615-625.
- [8]- R.J. Gordon, F.D. Lowy. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis*. 2008; 46 (5): 350-359.
- [9]- B. Tarai, P. Das, D. Kumar. Recurrent challenges for clinicians: emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin resistance, and current treatment options. *J Lab Physicians*. 2013; 5 (2): 71-78.
- [10]- F. Awad, C. Ramprasath, K. Udayakumar, N. Mathivanan, P.R. Aruna, S. Ganesan. In vitro photodynamic antimicrobial activity of protoporphyrin IX in the presence of hydrogen peroxide against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Br Microbiol Res J*. 2014; 4(11): 1219-1234.
- [11]- A. Tavares, C.M.B. Carvalho, M.A. Faustino, M.G. Neves, J.P.C. Tomé, A.C. Tomé, J.A.S. Cavaleiro, Â. Cunha, N.C.M. Gomes, E. Alves, A. Almeida. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. *Mar Drugs*. 2010; 8 (1): 91-105.
- [12]- C. Sekse, J. Bohlin, E. Skjerve, G.E. Vegarud. Growth comparison of several *Escherichia coli* strains exposed to various concentrations of lactoferrin using linear spline regression. *Microb Inform Exp*. 2012; 2 (5). doi: 10.1186/2042-5783-2-5.
- [13]- R.M. Vejborg, V. Hancock, M.A. Schembri, P. Klemm. Comparative genomics of *Escherichia coli* strains causing urinary tract infections. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77 (10): 3268-3278.

- [14]- M.A. Sampaio de Melo, J.P. Marques Lima Rolim, I.C. Junqueira Zanin, E.B. Barros, E. Façanhada-Costa, L.K. Azevedo Rodrigues. Characterization of antimicrobial photodynamic therapy - treated *Streptococci mutans*: An atomic force microscopy study. *Photomed Laser Surg.* 2013; 31 (3): 105-109.
- [15]- N. Kashef, G.R. Sharif Abadi, G.E. Djavid. Phototoxicity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multi-drug resistant *Escherichia coli*. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2012; 9 (1): 11-15.
- [16]- H.M. Tang, M.R. Hamblin, C.M. Yow. A comparative in vitro photoinactivation study of clinical isolates of multidrug-resistant pathogens. *J Infect Chemother.* 2007; 13 (2): 87-91.
- [17]- N. Sung, S. Back, J.H. Jung, K.H. Kim, J.K. Kim, J.H. Lee, Y. Ra, H.C. Yang, C. Lim, S. Cho, K. Kim, S. Jheon. Inactivation of multidrug resistant (MDR)- and extensively drug resistant (XDR)-*Mycobacterium tuberculosis* by photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013; 10 (4): 694-702.
- [18]- D.M.A. Vera, M.H. Haynes, A.R. Ball, T. Dai, C. Astrakas, M.J. Kelso, M.R. Hamblin, G.P. Tegos. Strategies to potentiate antimicrobial photoinactivation by overcoming resistant phenotypes. *Photochem Photobiol.* 2012; 88 (3): 499-511.
- [19]- L. Costa, J.P.C. Tomé, M.G. Neves, A.C. Tomé, J.A.S. Cavaleiro, M.A.F. Faustino, Â. Cunha, N.C.M. Gomes, A. Almeida. Evaluation of resistance development and viability recovery by a non-enveloped virus after repeated cycles of aPDT. *Antiviral Res.* 2011; 91 (3): 278-282.
- [20]- T.G. St. Denis, T. Dai, L. Izikson, C. Astrakas, R.R. Anderson, M.R. Hamblin, G.P. Tegos. All you need is light. Antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease. *Virulence.* 2011; 2 (6): 509-520.
- [21]- T. Kiesslich, A. Gollmer, T. Maisch, M. Berneburg, K. Plaetzer. A comprehensive tutorial on in vitro characterization of new photosensitizers for photodynamic antitumor therapy and photodynamic inactivation of microorganisms. *BioMed Res Int.* 2013; 2013: 1-17. ID 840417.
- [22]- F. Pereira Gonzales, T. Maisch. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. *Fungal Biol.* 2012; 116(1): 1-10.

- [23]- M.S. Baptista, M. Wainwright. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) for the treatment of malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis. *Braz J Med Biol Res.* 2011; 44 (1): 1-10.
- [24]- T. Dai, B.B. Fuchs, J.J. Coleman, R.A. Prates, C. Astrakas, T.G. St. Denis, M.S. Ribeiro, E. Mylonakis, M.R. Hamblin, G.P. Tegos. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Front Microbiol.* 2012; 3 (120). doi: 10.3389/fmicb.2012.00120.
- [25]- S. Nazzal, C.P. Chen, T. Tsai. Nanotechnology in antimicrobial photodynamic inactivation. *J Food Drug Anal.* 2011; 19 (4): 383-395.
- [26]- N. Hakimiha, F. Khoei, A. Bahador, R. Fekrazad. The susceptibility of *Streptococcus mutans* to antibacterial photodynamic therapy: a comparison of two different photosensitizers and light sources. *J Appl Oral Sci.* 2014; 22(2): 80-84.
- [27]- F. Vatansever, W.C. de Melo, P. Avci, D. Vecchio, M. Sadasivam, A. Gupta, R. Chandran, M. Karimi, N.A. Parizotto, R. Yin, G.P. Tegos, M.R. Hamblin. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species-bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiol Rev.* 2013; 37 (6): 955-989.
- [28]- T.N. Demidova, F. Gad, T. Zahra, K.P. Francis, M.R. Hamblin. Monitoring photodynamic therapy of localized infections by bioluminescence imaging of genetically engineered bacteria. *J Photochem Photobiol B.* 2005; 81 (1): 15-25.
- [29]- M.B. Spesia, M. Rovera, E.N. Durantini. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mitis* by cationic zinc (II) phthalocyanines in media with blood derivatives. *Eur J Med Chem.* 2010; 45(6): 2198-2205.
- [30]- C.M. Cassidy, M.M. Tunney, N.D. Magee, J.S. Elborn, S. Bell, T.R. Raj Singh, R.F. Donnelly. Drug and light delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) of pulmonary pathogens: A pilot study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2011; 8 (1): 1-6.
- [31]- C. de Paula Eduardo, A.C. Corrêa Aranha, A. Simões, M.S. Bello-Silva, K. Muller Ramalho, M. Esteves-Oliveira, P. Moreira de Freitas, J. Marotti, J. Tunér. Laser treatment of recurrent herpes labialis: a literature review. *Lasers Med Sci.* 2014; 29 (4): 1517-1529.

- [32]- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI publication M7-A7. 7th Edition. Wayne, PA. 2006; 26 (2).
- [33]- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association. American Water Works Association. Washington. 22th. Edition. 2012.
- [34]- Y. Nitzan, A. Balzam-Sudakevitz, H. Ashkenazi. Eradication of *Acinetobacter baumannii* by photosensitized agents in vitro. *J Photochem Photobiol B*. 1998; 42 (3): 211-218.
- [35]- S.A.G. Lambrechts, M.C.G. Aalders, F.D. Verbraak, J.W.M. Lagerberg, J.B. Dankert, J.J. Schuitmaker. Effect of albumin on the photodynamic inactivation of microorganisms by a cationic porphyrin. *J Photochem Photobiol B*. 2005; 79 (1): 51-57.
- [36]- S.A. Lambrechts, M.C. Aalders, D.H. Langeveld-Klerks, Y. Khayali, J.W. Lagerberg. Effect of monovalent and divalent cations on the photoinactivation of bacteria with meso-substituted cationic porphyrins. *Photochem Photobiol*. 2004; 79 (3): 297-302.
- [37]- M. Nisnevitch, F. Nakonechny, Y. Nitzan. Photodynamic antimicrobial chemotherapy by liposome-encapsulated water-soluble photosensitizers. *Russ J Bioorganic Chem*. 2010; 36 (3): 363-369.
- [38]- Z. Sayed, F. Harris, D.A. Phoenix. A study on the bacterial photo-toxicity of phenothiazinium based photosensitisers. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005; 43 (3): 367-372.
- [39]- D.A. Phoenix, F. Harris. Phenothiazinium-based photosensitizers: antibacterials of the future? *Trends Mol Med*. 2003; 9 (7): 283-285.
- [40]- M. Wainwright. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother*. 1998; 42 (1): 13-28.
- [41]- T.S. Mang, L. Mikulski, R.E. Hall. Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant *Candida* species. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2010; 7 (2): 98-105.

- [42]- T. Dai, Y.Y. Huang, M.R. Hamblin. Photodynamic therapy for localized infections: State of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2009; 6 (3-4): 170-188.
- [43]- B.B. Fischer, A. Krieger-Liszkay, R.I.L. Eggen. Oxidative stress induced by the photosensitizers neutral red (type I) or rose bengal (type II) in the light causes different molecular responses in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Science.* 2005; 168 (3): 747-759.
- [44]- D.A. Phoenix, Z. Sayed, S. Hussain, F. Harris, M. Wainwright. The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003; 39 (1): 17-22.
- [45]- M.L. Agazzi, M.B. Spesia, N.S. Gsponer, M.E. Milanesio, E.N. Durantini. Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of a fulleropyrrolidine bearing a basic amino group and its dicationic analog against *Staphylococcus aureus*. *J Photochem Photobiol A.* 2015; 310: 171-179.
- [46]- N.S. Gsponer, M.B. Spesia, E.N. Durantini. Effects of divalent cations, EDTA and chitosan on the uptake and photoinactivation of *Escherichia coli* mediated by cationic and anionic porphyrins. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015; 12 (1): 67-75.
- [47]- V. Kussovski, V. Mantareva, I. Angelov, P. Orozova, D. Wöhrle, G. Schnurpfeil, E. Borisova, L. Avramov. Photodynamic inactivation of *Aeromonas hydrophila* by cationic phthalocyanines with different hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters.* 2009; 294 (2): 133-140.
- [48]- L. Cincotta, J.W. Foley, A.H. Cincotta. Novel Red absorbing benzo[α]phenoxazinium and benzo[α]phenothiazinium photosensitizers: in vitro evaluation. *Photochem Photobiol.* 1987; 46 (5): 751-758.
- [49]- C.W. Lin, J.R. Shulok, S.D. Kirley, L. Cincotta, J.W. Foley. Lysosomal localization and mechanism of uptake of Nile blue photosensitizers in tumor cells. *Cancer Res.* 1991; 51 (10): 2710-2719
- [50]- T.N. Demidova, M.R. Hamblin. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49 (6): 2329-2335.
- [51]- S.F. Godinho Vilela, J. Campos Junqueira, J. Oliveira Barbosa, M. Majewski, E. Munin, A.O. Cardoso Jorge. Photodynamic inactivation of *Staphylococcus*

aureus and *Escherichia coli* biofilms by malachite green and phenothiazine dyes: an in vitro study. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(6): 704-710.

[52]- M.N. Usacheva, M.C. Teichert, M.A. Biel. The role of methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the protoinactivation of bacteria. *J Photochem Photobiol B.* 2003; 71(1-3): 87-98.

[53]- Y.N. Konan, R. Gurny, E. Allémann. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2002; 66 (2): 89-106.

[54]- D.W.R. Gray, P.R. Millard, P. McShane, P.J. Morris. The use of the dye neutral red as a specific, non-toxic, intra-vital stain of islets of Langerhans. *Br J Exp Path.* 1983; 64 (5): 553-558.

[55]- G. Repetto, A. del Peso, J.L. Zurita. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc.* 2008; 3 (7): 1125-1131.

[56]- A. Gorman, J. Killoran, C. O'Shea, T. Kenna, W.M. Gallagher, D.F. O'Shea. In vitro demonstration of the heavy-atom effect for photodynamic therapy. *J Am Chem Soc.* 2004; 126(34): 10619-10631.

[57]- S.H.D. Lacerda, B. Abraham, T.C. Stringfellow, G.L. Indig. Photophysical, photochemical, and tumor-selectivity properties of bromine derivatives of rhodamine-123. *Photochem Photobiol.* 2005; 81 (6): 1430-1438.

[58]- M.N. Montes de Oca, J. Vara, L. Milla, V. Rivarola, C.S. Ortiz. Physicochemical properties and photodynamic activity of novel derivatives of triarylmethane and thiazine. *Arch Pharm Chem Life Sci.* 2013; 346 (4): 255-265.

[59]- Y. Nitzan, M. Gutterman, Z. Malik, B. Ehrenberg. Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *Photochem Photobiol.* 1992; 55 (1): 89-96.

CONCLUSIONES GENERALES Y PROYECCIONES

Considerando los importantes efectos adversos que evidencian los compuestos FS aprobados por las Autoridades Regulatorias, se planteó el desarrollo de nuevas entidades químicas con aplicaciones terapéuticas fotodinámicas.

Las diversas actividades abordadas permitieron sintetizar con excelente rendimiento y pureza, tres nuevos derivados bromados, NRBr, CVBr₃ y CRBr₃. Tanto los reactivos de partida como los nuevos compuestos, se caracterizaron inequívocamente mediante las técnicas de rutina.

Mediante el análisis de diversas variables relativas a las propiedades espectrales de los compuestos evaluados en este trabajo de Tesis Doctoral, se evidenció que diferentes solventes, concentraciones del FS y la sustitución molecular impactan en gran medida sobre el comportamiento de agregación. Los estudios realizados, permitieron caracterizar las especies monoméricas en distintos medios, corroborando las asignaciones realizadas mediante cálculos teóricos. Se concluyó que los nuevos derivados NRBr y CVBr₃, se agregaron a mayores concentraciones que sus respectivos precursores, lo cual se atribuyó al impedimento estérico generado por los átomos de bromo presentes en la molécula. Ésta característica presenta fundamental relevancia, ya que la formación de agregados modifica el espectro de absorción y las propiedades fotoquímicas de las moléculas, impactando en la capacidad fotosensibilizadora.

Además, las actividades abordadas permitieron determinar de manera satisfactoria el valor de pK_a del nuevo derivado NRBr, en tanto que el desarrollo de un método cromatográfico empleando RP-HPLC, permitió demostrar que los nuevos FS bromados son más lipofílicos en comparación con sus respectivos precursores, lo que podría contribuir de manera sólida al incremento de la eficacia fotodinámica. Por su parte, los compuestos pertenecientes a la Familia de

las Azinas demostraron ser estables en los diferentes medios ensayados. Las experiencias realizadas con relación a la determinación de $^1\text{O}_2$ indicaron que el precursor NR y el nuevo derivado halogenado, NRBr, son muy buenos productores, siendo importante destacar que la evaluación se realizó sobre la forma monomérica del compuesto. En la **Tabla** se presentan los resultados obtenidos con relación a las diversas propiedades fisicoquímicas y fotoquímicas determinadas para los compuestos evaluados.

Tabla: Resumen de las propiedades fisicoquímicas y fotoquímicas de los compuestos evaluados en este trabajo de Tesis Doctoral.

Compuesto	Log P _{HPLC}	ϕ_{Δ}^*	pK _a	Estabilidad	Fotoestabilidad
NR	3,2±0,1	1,16	7,0±0,8	Estable	Estable
NRBr	3,8±0,1	3,14	5,8±0,1	Estable	Estable
CV	2,9±0,1	0,04	ND	ND	ND
CVBr ₃	4,5±0,1	0,11	ND	ND	ND
CR	3,7±0,1	0,17	ND	ND	ND
CRBr ₃	5,5±0,4	0,65	ND	ND	ND

*Relativos a MB en DMF. ND: No Determinado.

Finalmente, el nuevo derivado NRBr exhibió un incremento significativo en la acción fotoantimicrobiana frente a *S. aureus*, evidenciando mejoras relevantes en comparación con el precursor, NR. Este incremento se observó en ambas cepas evaluadas, la sensible y la resistente a metilina. Como consecuencia, la bromación de NR condujo a un incremento de la actividad, permitiendo destacar la relevancia de los FS bromados y su potencial impacto en la IFD. Estos estudios sugieren que el nuevo derivado es agente FS prometedor para aplicaciones terapéuticas fotodinámicas.

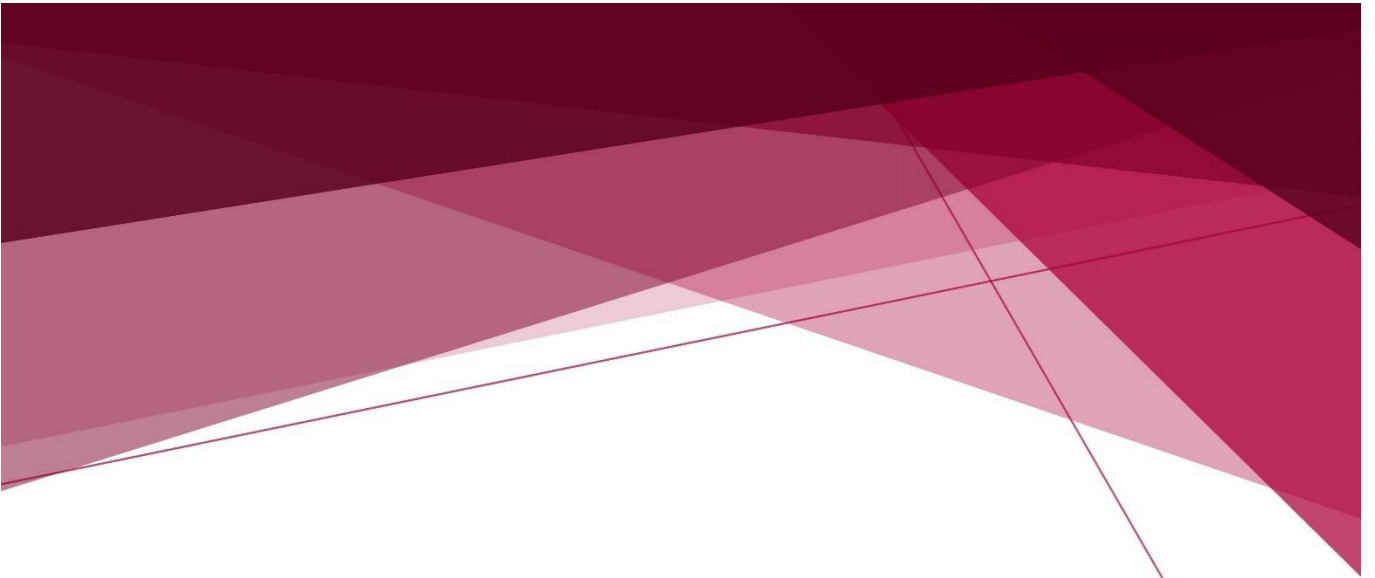
Los estudios desarrollados señalan que la halogenación mejora las propiedades de los precursores, sentando las bases para la evaluación y la importancia

destacada de los derivados tribromados pertenecientes a la Familia de las Oxazinas y Oxazonas, sintetizadas y caracterizadas en el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Resulta significativa la proyección de este trabajo y la necesidad de profundizar nuevos aspectos relativos al mecanismo de acción fotoantimicrobiano de NR y NRBr, como así también su evaluación frente a *E. coli* en combinación con agentes que modifiquen la permeabilidad de la pared celular, con la finalidad de incrementar la actividad fotodinámica que evidenciaron frente a esta cepa. En adición, es de fundamental importancia la evaluación de ambos compuestos frente a otros microorganismos como *P. aeruginosa* y *C. albicans*.

Por su parte, es relevante destacar la evaluación de la IFD de los compuestos pertenecientes a la Familia de las Oxazinas y Oxazonas, frente a diversos microorganismos de actual relevancia clínica.

Además, la evaluación de la actividad de los compuestos involucrados en este trabajo de Tesis Doctoral frente a diversas líneas celulares cancerígenas (TFD) se presenta como un gran desafío.



ANEXOS



ÍNDICE ANEXOS

ANEXO 1: CARACTERIZACIÓN DE <i>NEUTRAL RED</i>	263
Anexo 1.1: Espectro de RMN- ¹ H	265
Anexo 1.2: Espectro de RMN- ¹³ C	266
Anexo 1.3: Espectro obtenido de experimentos COSY	267
Anexo 1.4: Espectro obtenido de experimentos HSQC	268
Anexo 1.5: Espectro de Masa de Alta Resolución ESI-micro QTOF	269
Anexo 1.6: Espectro de Masa de Ionización por Electrospray	269
Anexo 1.7: Espectro de Masa de Impacto Electrónico	270
Anexo 1.8: Espectro Infrarrojo	270
ANEXO 2: CARACTERIZACIÓN DE <i>NEUTRAL RED</i> MONOBROMADO	271
Anexo 2.1: Espectro de RMN- ¹ H	273
Anexo 2.2: Espectro de RMN- ¹³ C	274
Anexo 2.3: Espectro obtenido de experimentos COSY	275
Anexo 2.4: Espectro obtenido de experimentos HSQC	276
Anexo 2.5: Espectro obtenido de experimentos HMBC	277
Anexo 2.6: Espectro de Masa de Alta Resolución ESI-micro QTOF	278
Anexo 2.7: Espectro de Masa de Ionización por Electrospray	278
Anexo 2.8: Espectro de Masa de Impacto Electrónico	279
Anexo 2.9: Espectro Infrarrojo	279
ANEXO 3: CARACTERIZACIÓN DE <i>CRESYL VIOLET</i>	281

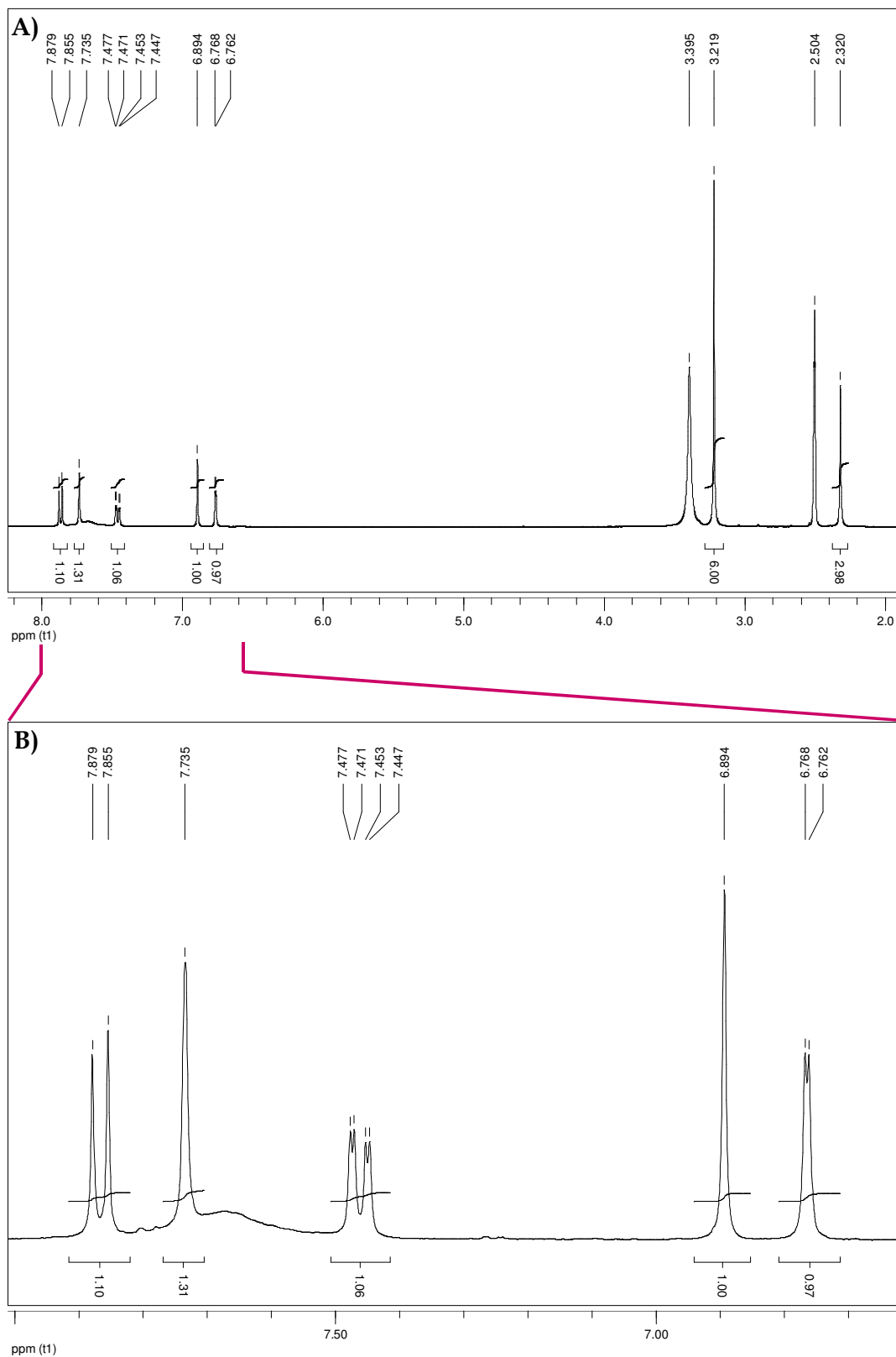
Anexo 3.1: Espectro de RMN- ¹ H	283
Anexo 3.2: Espectro de RMN- ¹³ C	284
Anexo 3.3: Espectro obtenido de experimentos COSY	285
Anexo 3.4: Espectro obtenido de experimentos HSQC	286
Anexo 3.5: Espectro obtenido de experimentos HMBC	287
Anexo 3.6: Espectro de Masa de Alta Resolución ESI-micro QTOF	288
Anexo 3.7: Espectro de Masa de Ionización por Electropray	288
Anexo 3.8: Espectro de Masa de Impacto Electrónico	289
Anexo 3.9: Espectro Infrarrojo	289
ANEXO 4: CARACTERIZACIÓN DE CRESYL VIOLET TRIBROMADO ...	291
Anexo 4.1: Espectro de RMN- ¹ H	293
Anexo 4.2: Espectro de RMN- ¹ H con agua deuterada	294
Anexo 4.3: Espectro de RMN- ¹³ C	295
Anexo 4.4: Espectro obtenido de experimentos COSY	296
Anexo 4.5: Espectro obtenido de experimentos COSY con agua deuterada	297
Anexo 4.6: Espectro obtenido de experimentos HSQC	298
Anexo 4.7: Espectro obtenido de experimentos HMBC	299
Anexo 4.8: Espectro de Masa de Alta Resolución ESI-micro QTOF	300
Anexo 4.9: Espectro de Masa de Impacto Electrónico	300
Anexo 4.10: Espectro Infrarrojo	301
ANEXO 5: CARACTERIZACIÓN DE CRESYL RED	303
Anexo 5.1: Espectro de RMN- ¹ H	305
Anexo 5.2: Espectro de RMN- ¹³ C	306

Anexo 5.3: Espectro obtenido de experimentos COSY	307
Anexo 5.4: Espectro obtenido de experimentos HSQC	308
Anexo 5.5: Espectro de obtenido de experimentos HMBC.....	309
Anexo 5.6: Espectro de Masa de Alta Resolución ESI-micro QTOF	310
Anexo 5.7: Espectro de Masa de Impacto Electrónico.....	310
Anexo 5.8: Espectro Infrarrojo.....	311
ANEXO 6: CARACTERIZACIÓN DE CRESYL RED TRIBROMADO.....	313
Anexo 6.1: Espectro de RMN- ¹ H en DMSO-d ₆ a 67°C.....	315
Anexo 6.2: Espectro obtenido de experimentos PRESAT en DMSO-d ₆ a 47°C.....	316
Anexo 6.3: Espectro obtenido de experimentos COSY en DMSO-d ₆ a 67°C	317
Anexo 6.4: Espectro de RMN- ¹ H en CDCl ₃	318
Anexo 6.5: Espectro de Masa de Alta Resolución ESI-micro QTOF	319
Anexo 6.6: Espectro de Masa de Impacto Electrónico.....	319
Anexo 6.7: Espectro Infrarrojo.....	320
ANEXO 7: CROMATOGRAMAS	321
Anexo 7.1: Cromatogramas RP-HPLC. Síntesis de <i>Neutral Red</i> monobromado	323
Anexo 7.2: Cromatogramas RP-HPLC. Síntesis de <i>Neutral Red</i> monobromado	324
ANEXO 8: MEDIOS EMPLEADOS EN INACTIVACIÓN FOTODINÁMICA	325
Anexo 8.1: Agar Müller-Hinton y Caldo Müller-Hinton	327

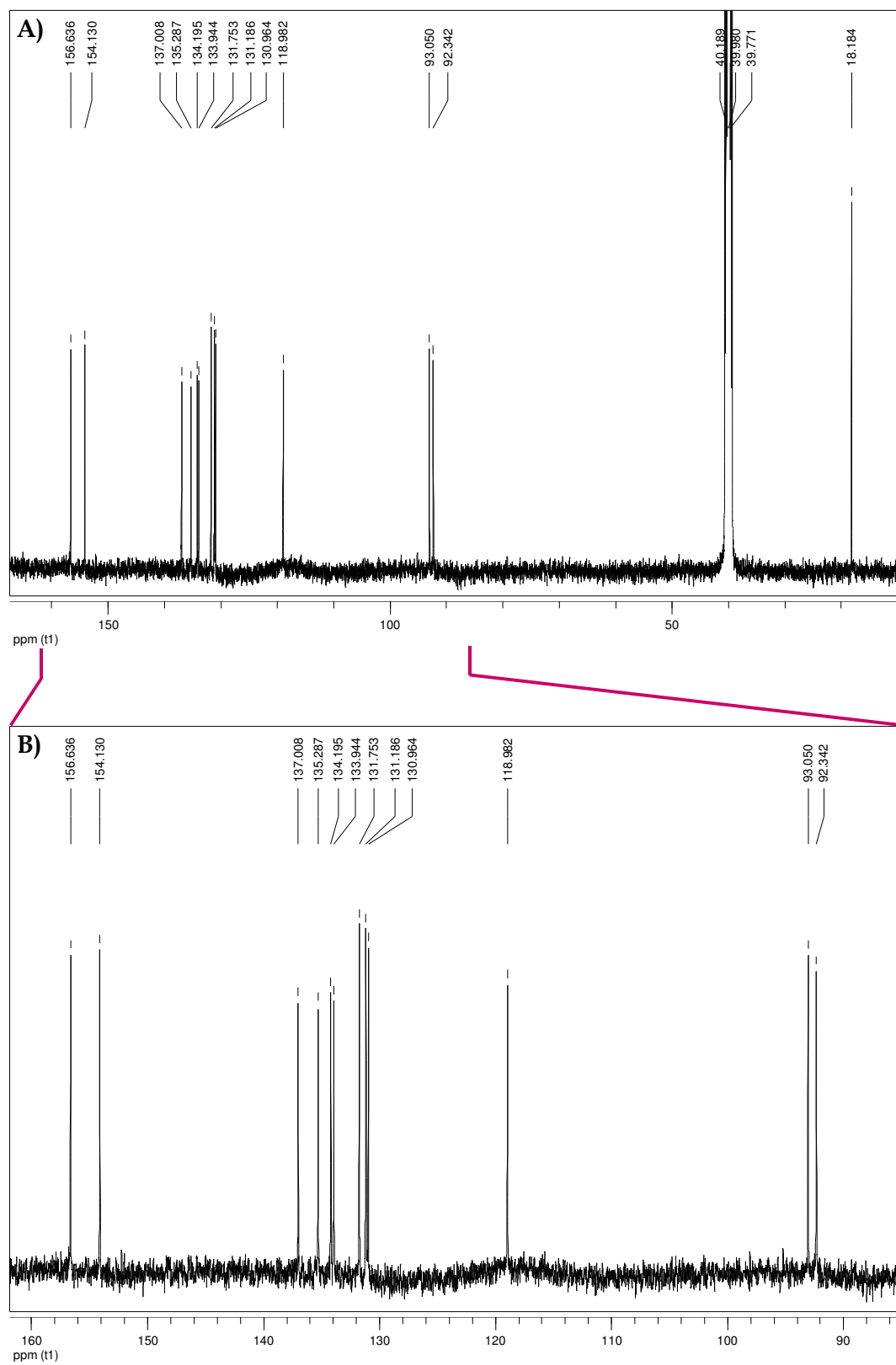
Anexo 8.2: Caldo Nutritivo	327
Anexo 8.3: <i>Buffer</i> Fosfato Salino	327
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS	331



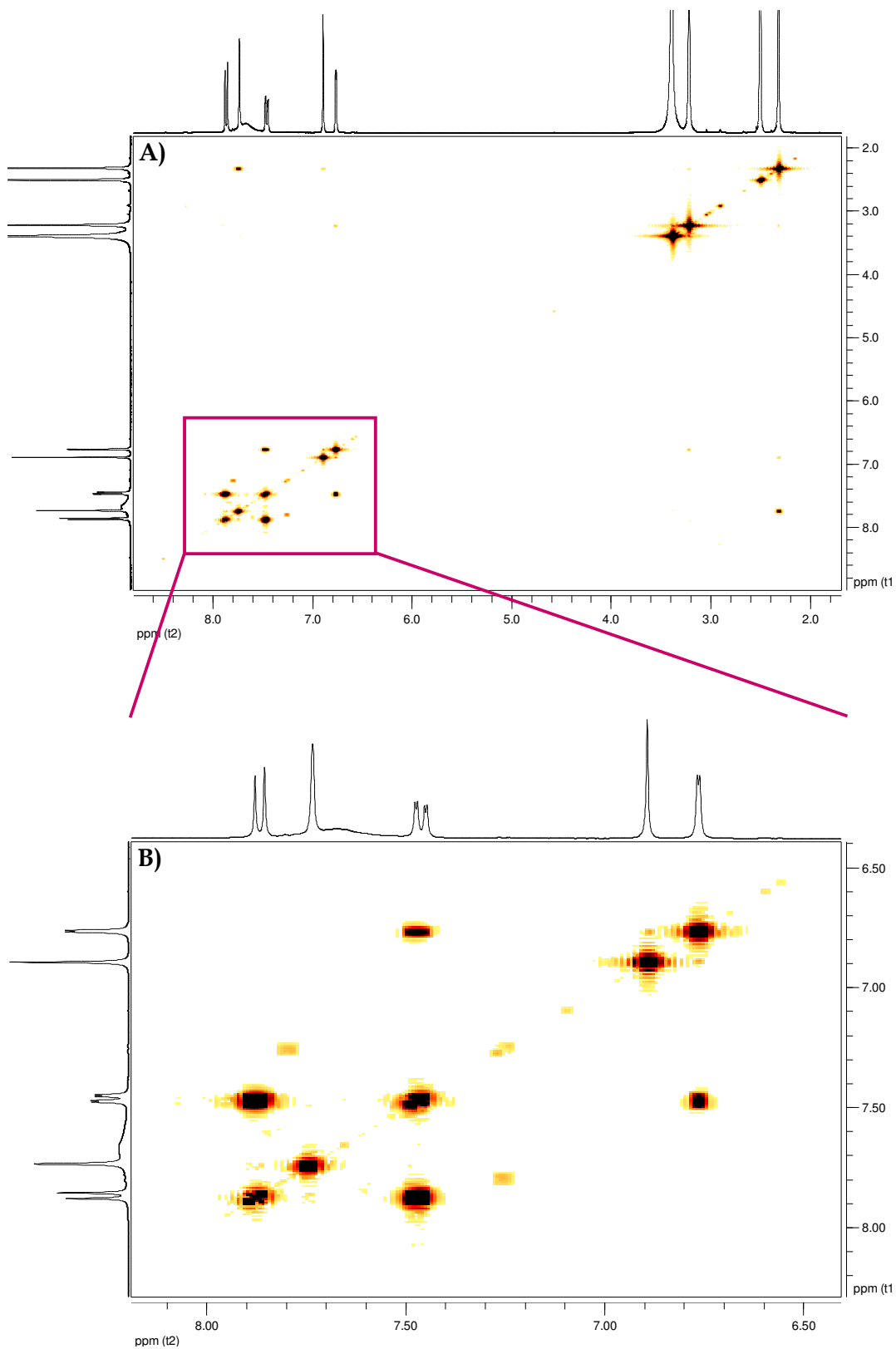
ANEXO 1
CARACTERIZACIÓN DE
NEUTRAL RED



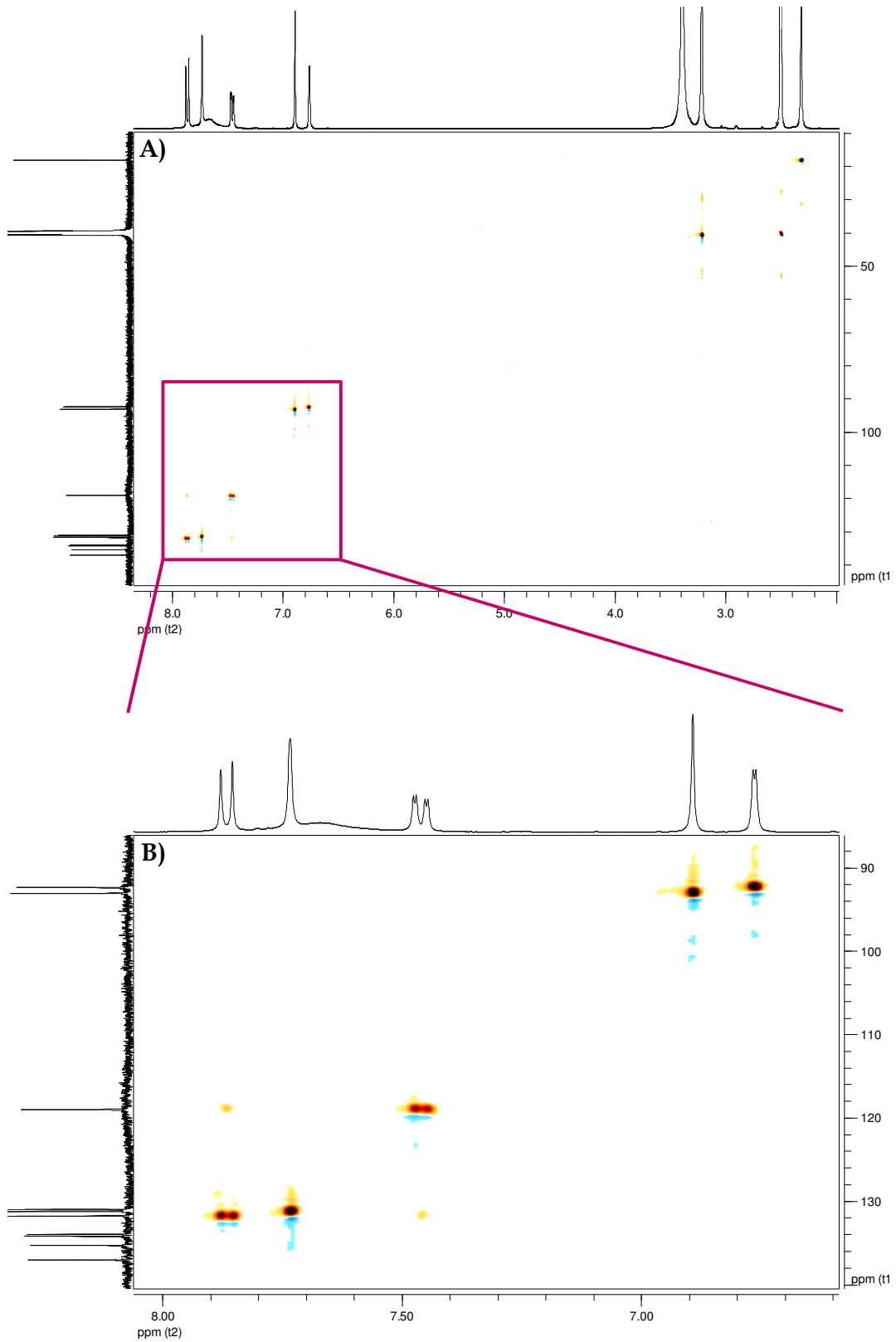
Anexo 1.1: Espectro de RMN- ^1H de *Neutral Red*. **A)** Espectro completo; **B)** Espectro ampliado.



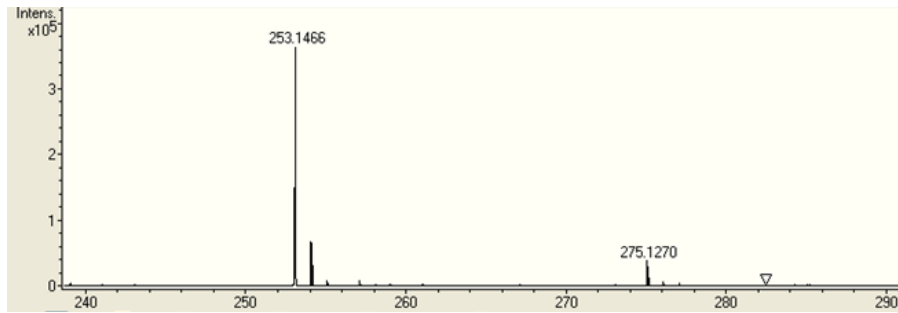
Anexo 1.2: Espectro de RMN-¹³C de Neutral Red. A) Espectro completo; B) Espectro ampliado.



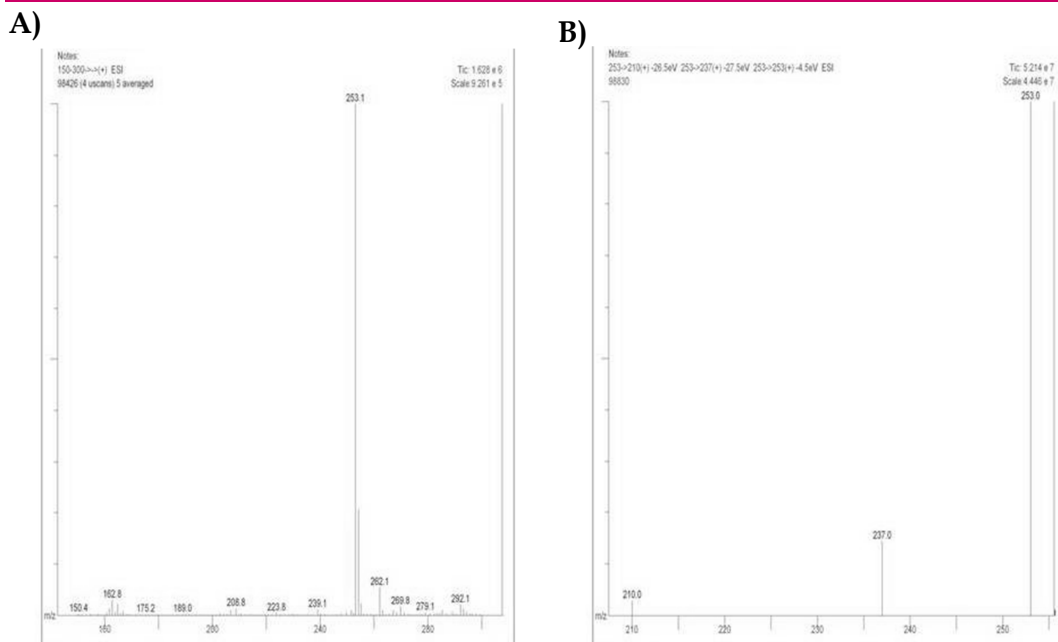
Anexo 1.3: Espectro de *Neutral Red* obtenido de experimentos COSY. **A)** Espectro completo; **B)** Espectro ampliado.



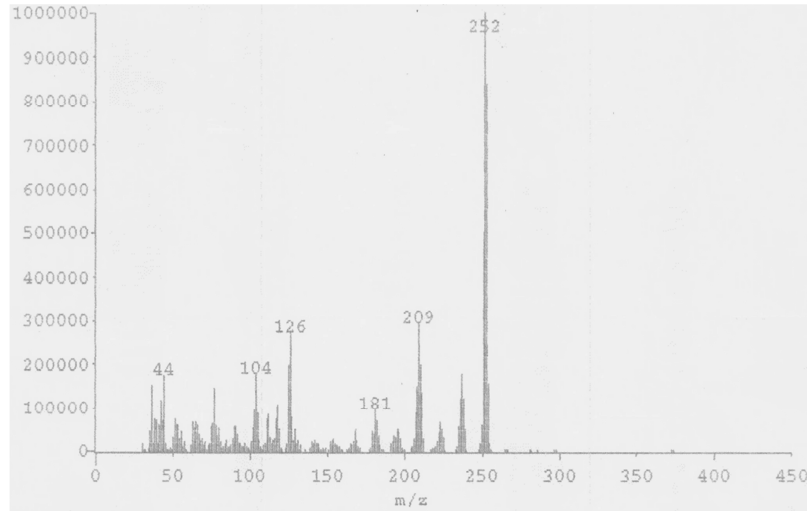
Anexo 1.4: Espectro de *Neutral Red* obtenido de experimentos HSQC. **A)** Espectro completo; **B)** Espectro ampliado.



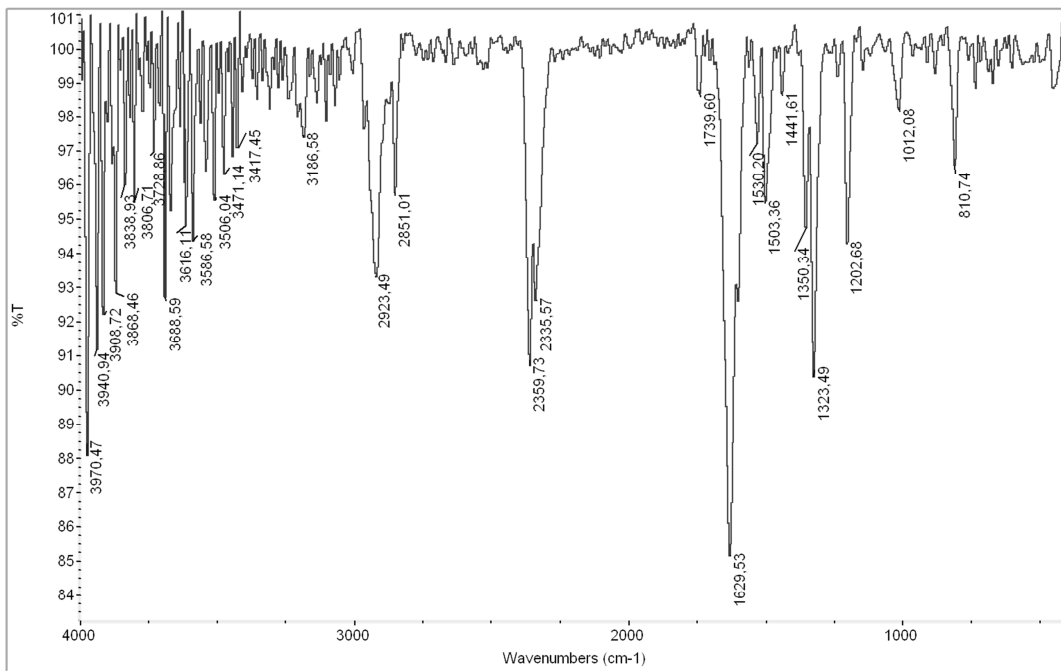
Anexo 1.5: Espectro de Masa de Alta Resolución ESI-micro QTOF de *Neutral Red*.



Anexo 1.6: Espectro de masa de ionización por electrospray de *Neutral Red*. **A)** ESI-MS; **B)** ESI-MS/MS en tándem.



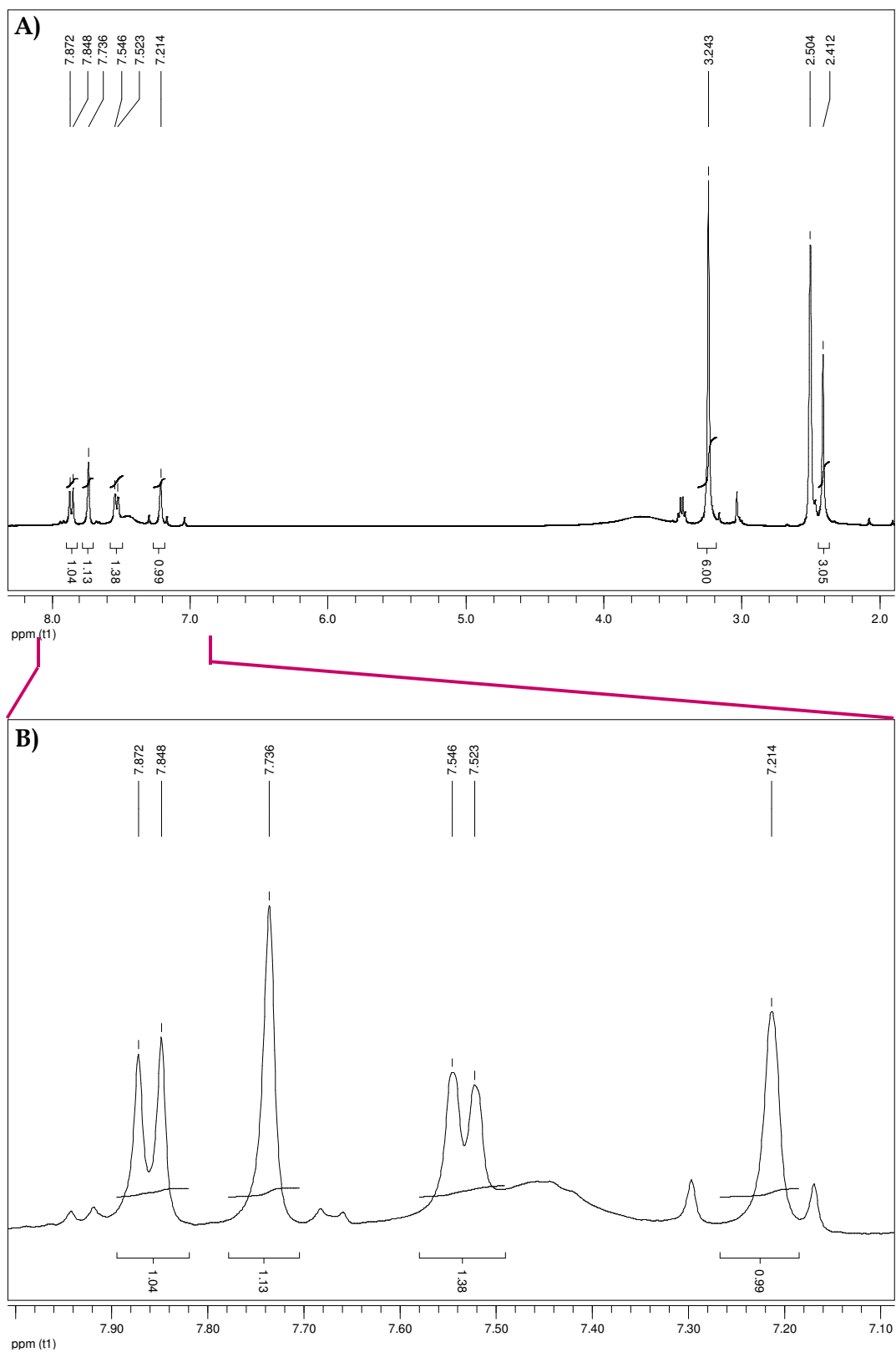
Anexo 1.7: Espectro de masa de impacto electrónico de *Neutral Red*.



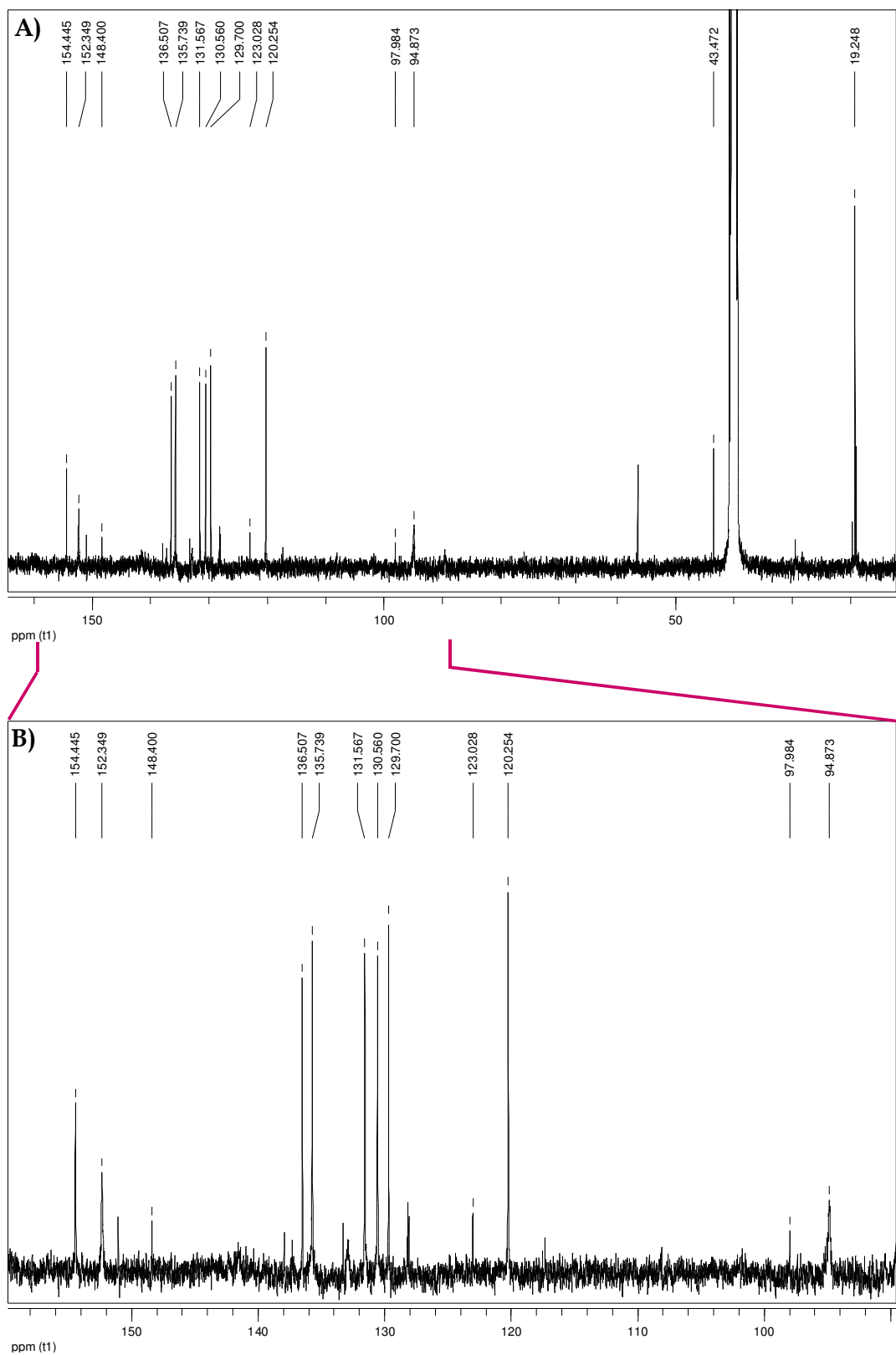
Anexo 1.8: Espectro Infrarrojo de *Neutral Red*.



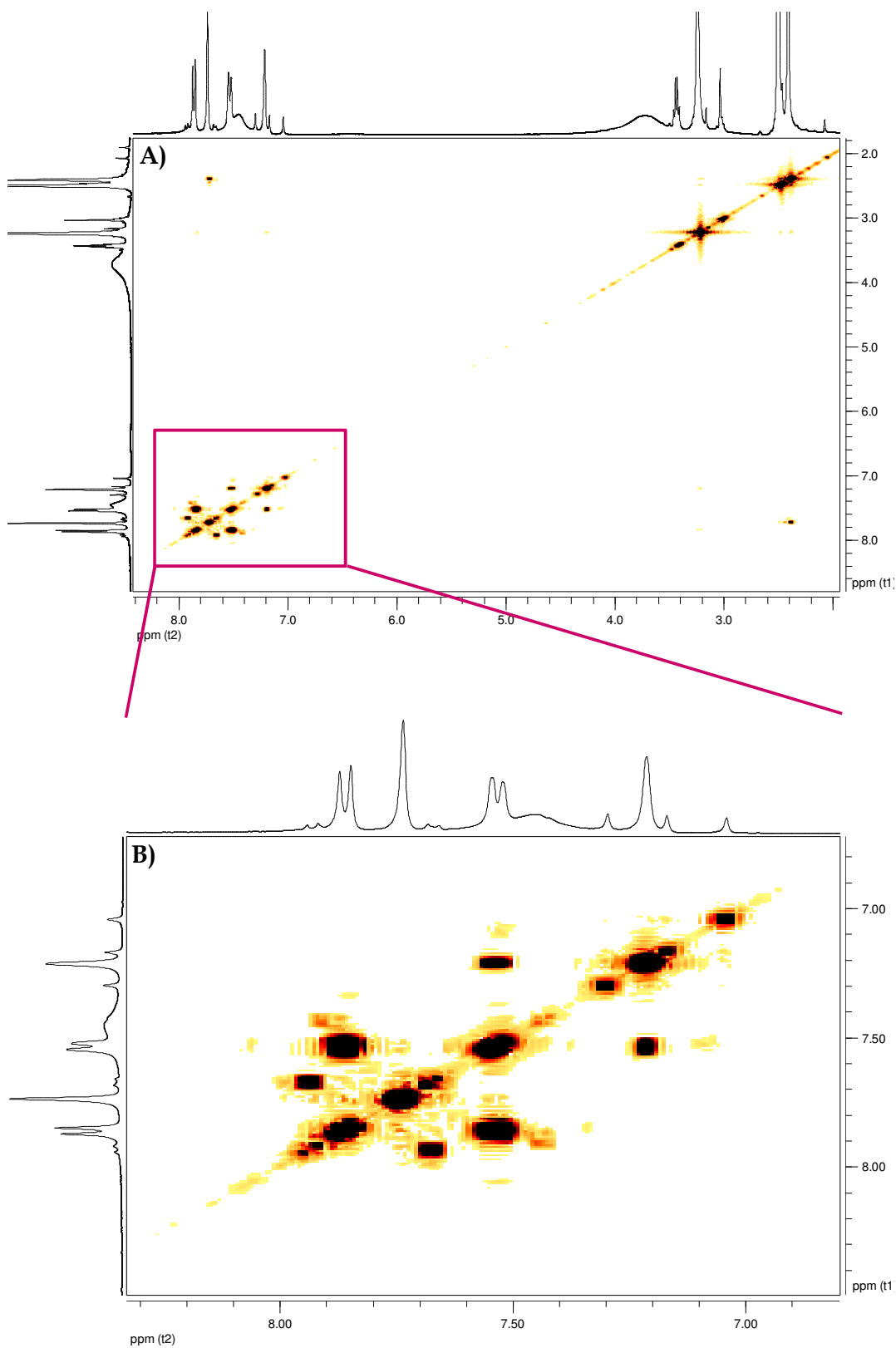
ANEXO 2
CARACTERIZACIÓN DE
NEUTRAL RED MONOBROMADO



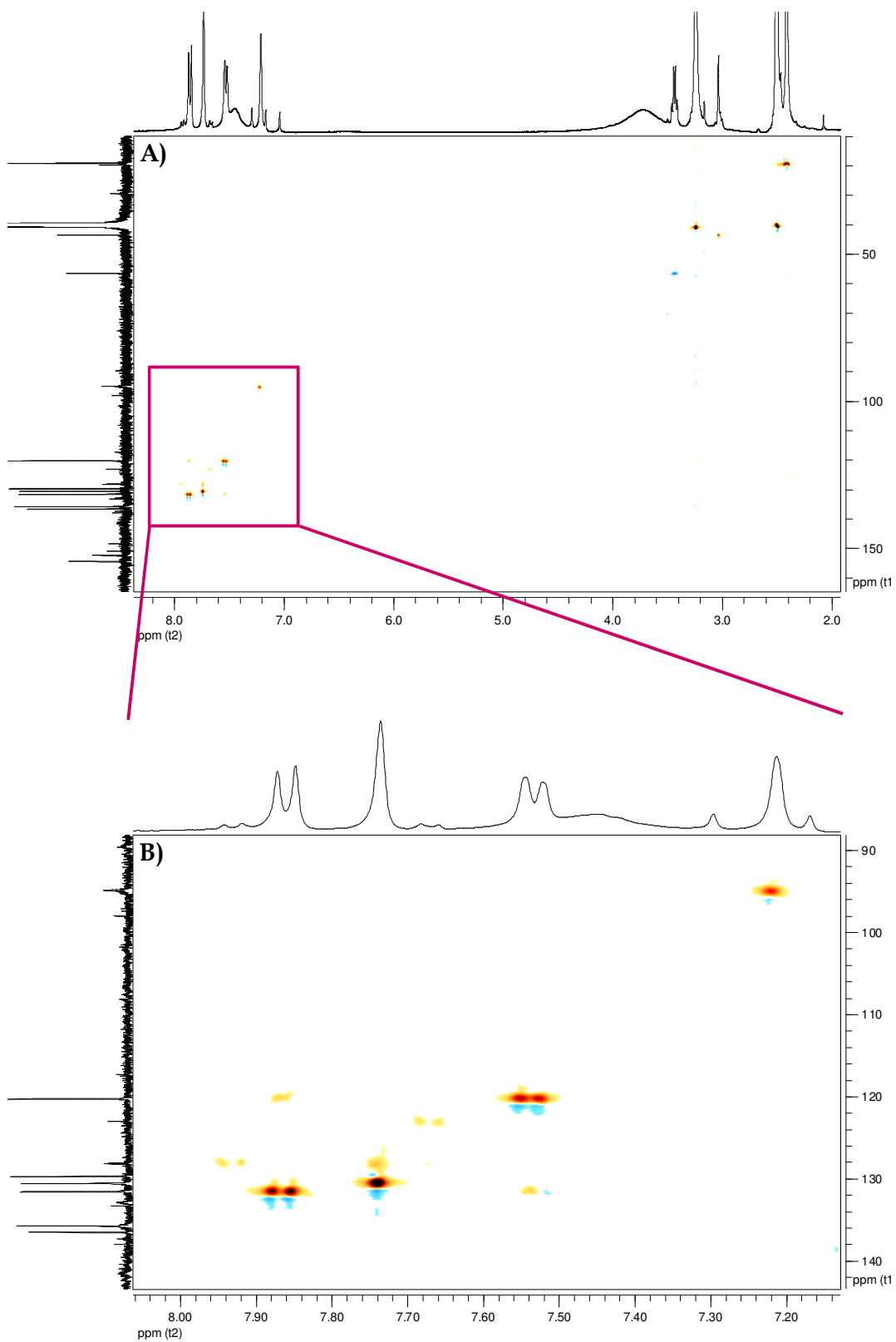
Anexo 2.1: Espectro de RMN- ^1H de *Neutral Red* monobromado. **A)** Espectro completo; **B)** Espectro ampliado.



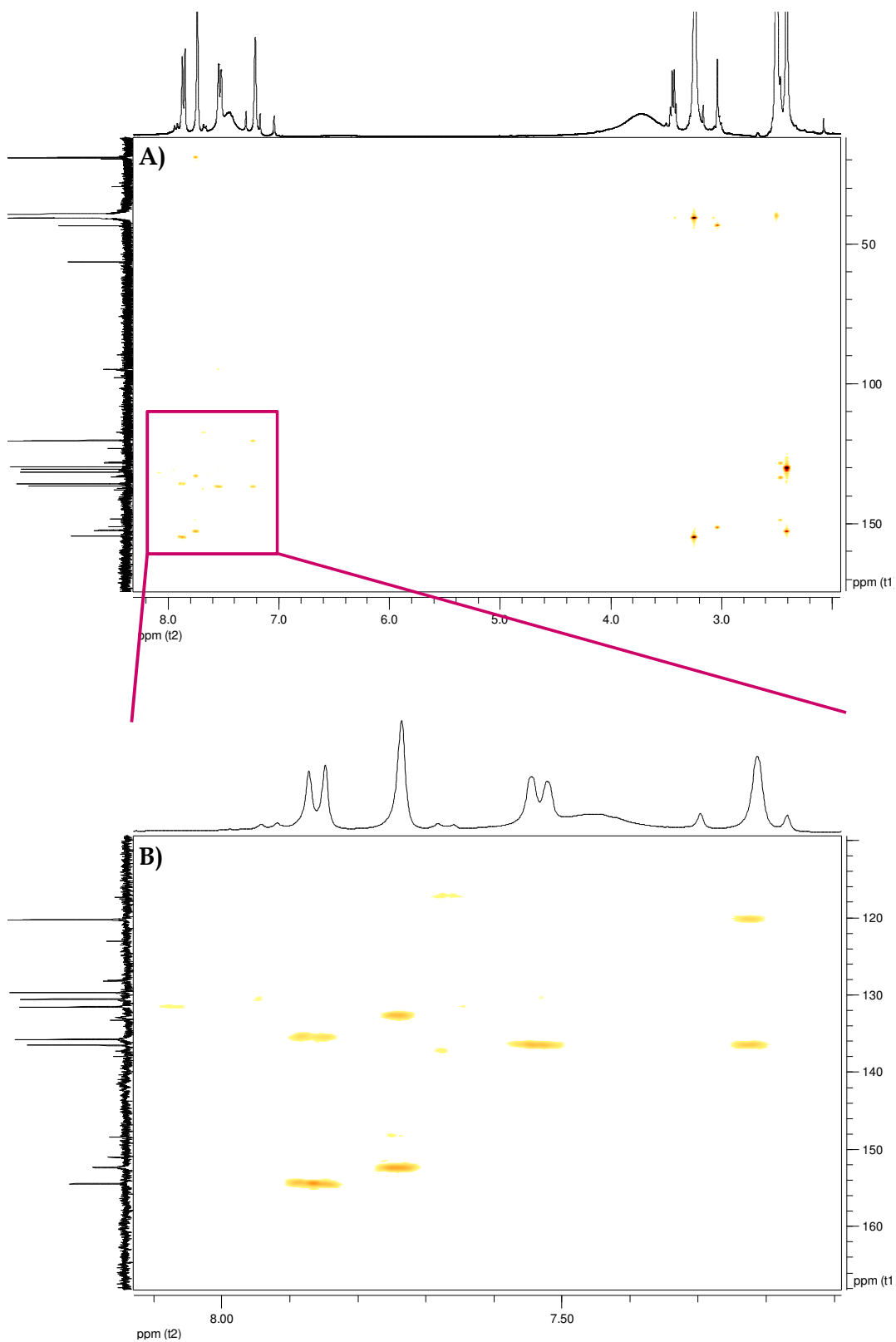
Anexo 2.2: Espectro de RMN- ^{13}C de *Neutral Red* monobromado. **A)** Espectro completo; **B)** Espectro ampliado.



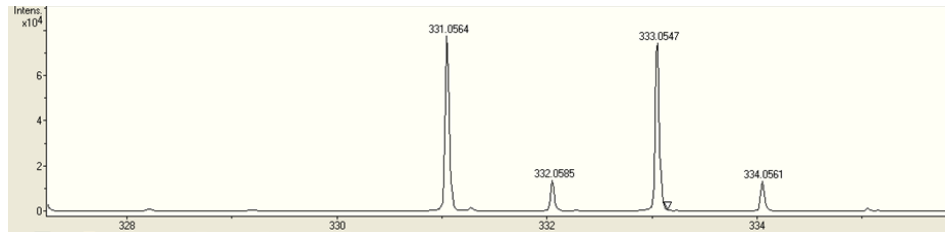
Anexo 2.3: Espectro de *Neutral Red* monobromado obtenido de experimentos COSY. **A)** Espectro completo; **B)** Espectro ampliado.



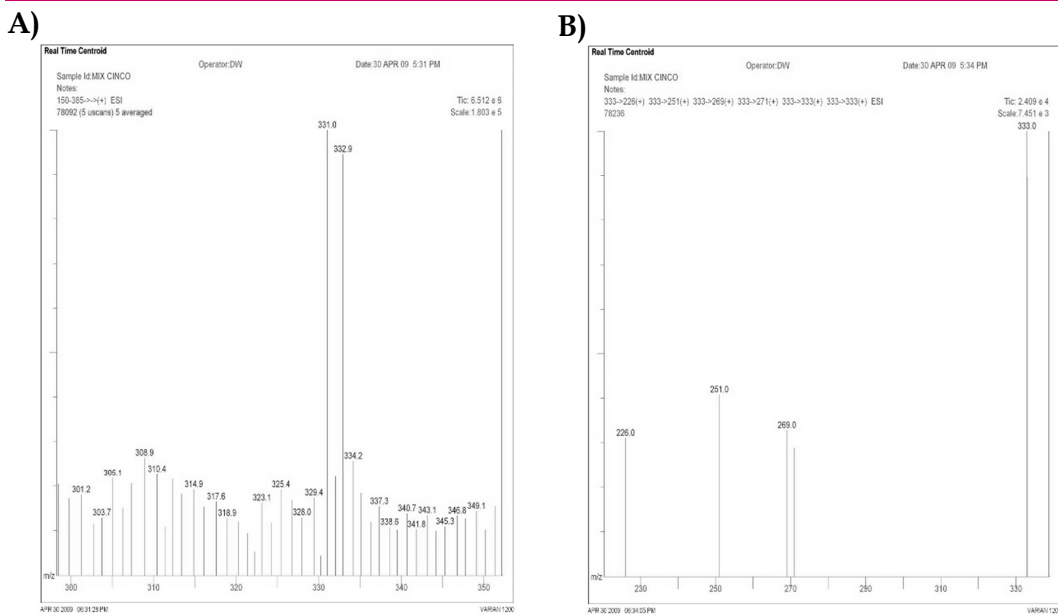
Anexo 2.4: Espectro de *Neutral Red* monobromado obtenido de experimentos HSQC. A) Espectro completo; B) Espectro ampliado.



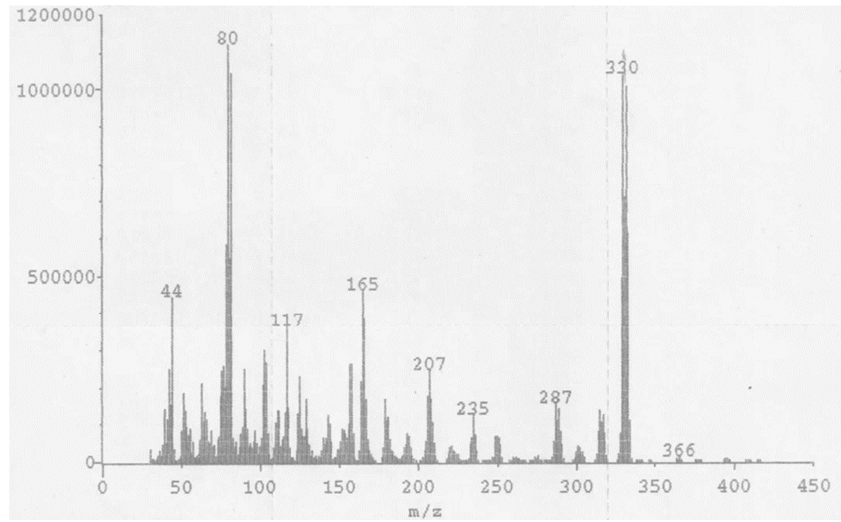
Anexo 2.5: Espectro de *Neutral Red* monobromado obtenido de experimentos HMBC. **A)** Espectro completo; **B)** Espectro ampliado.



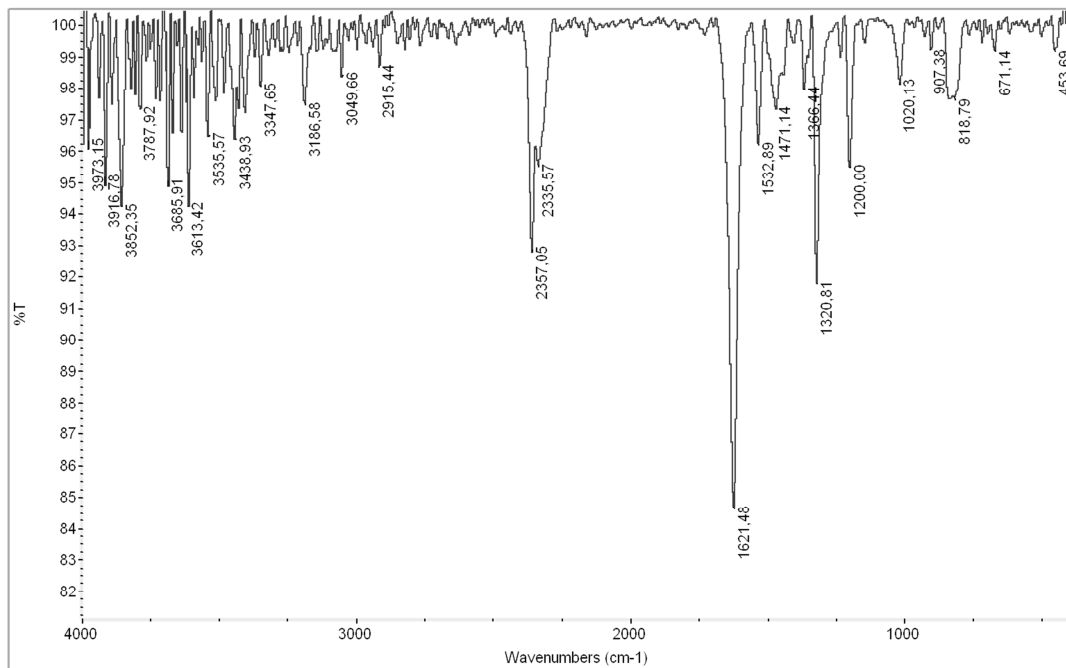
Anexo 2.6: Espectro de Masa de Alta Resolución ESI-micro QTOF de *Neutral Red* monobromado.



Anexo 2.7: Espectro de masa de ionización por electrospray de *Neutral Red* monobromado. A) ESI-MS; B) ESI-MS/MS en tándem.



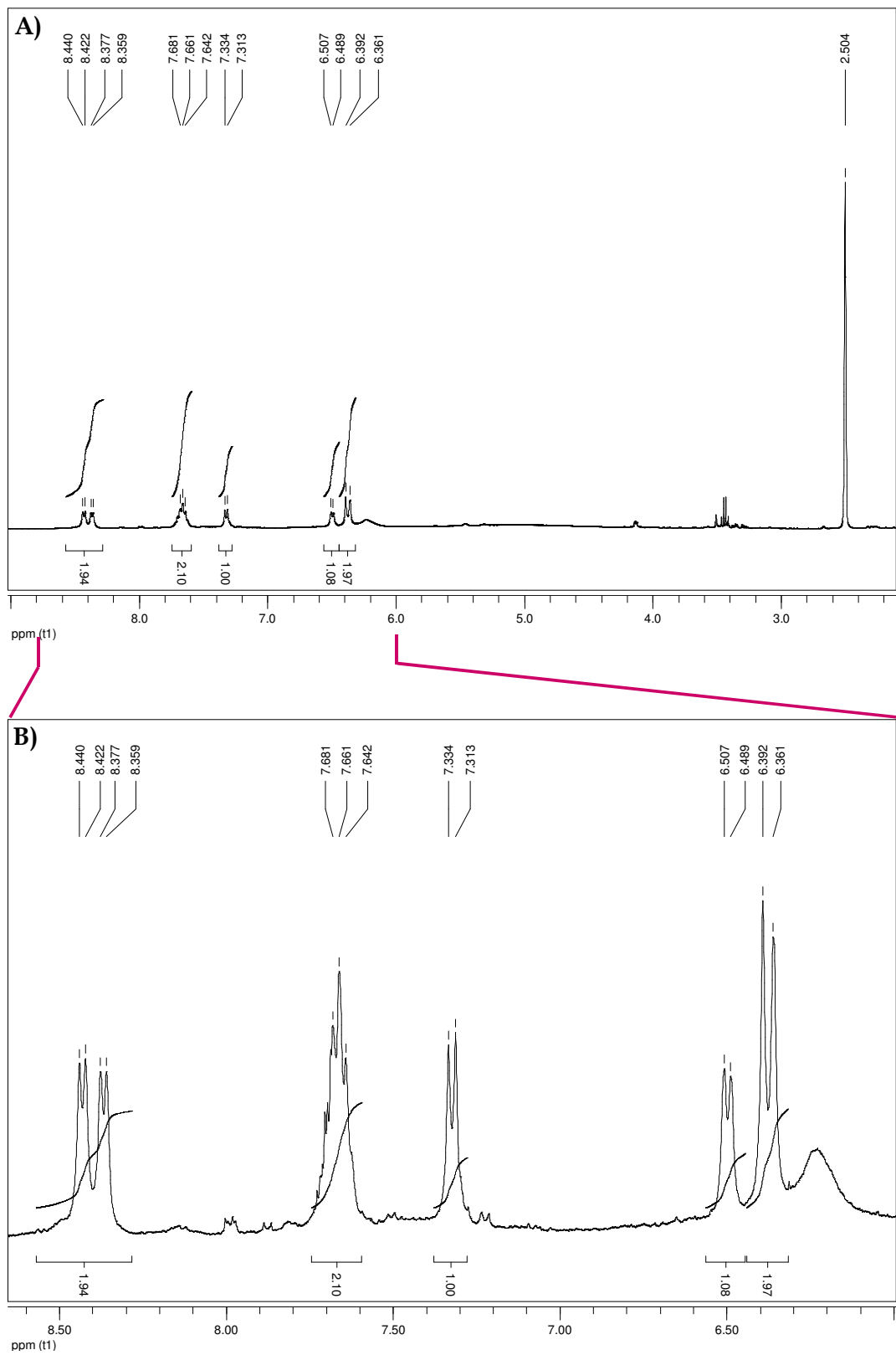
Anexo 2.8: Espectro de masa de impacto electrónico de *Neutral Red* monobromado.



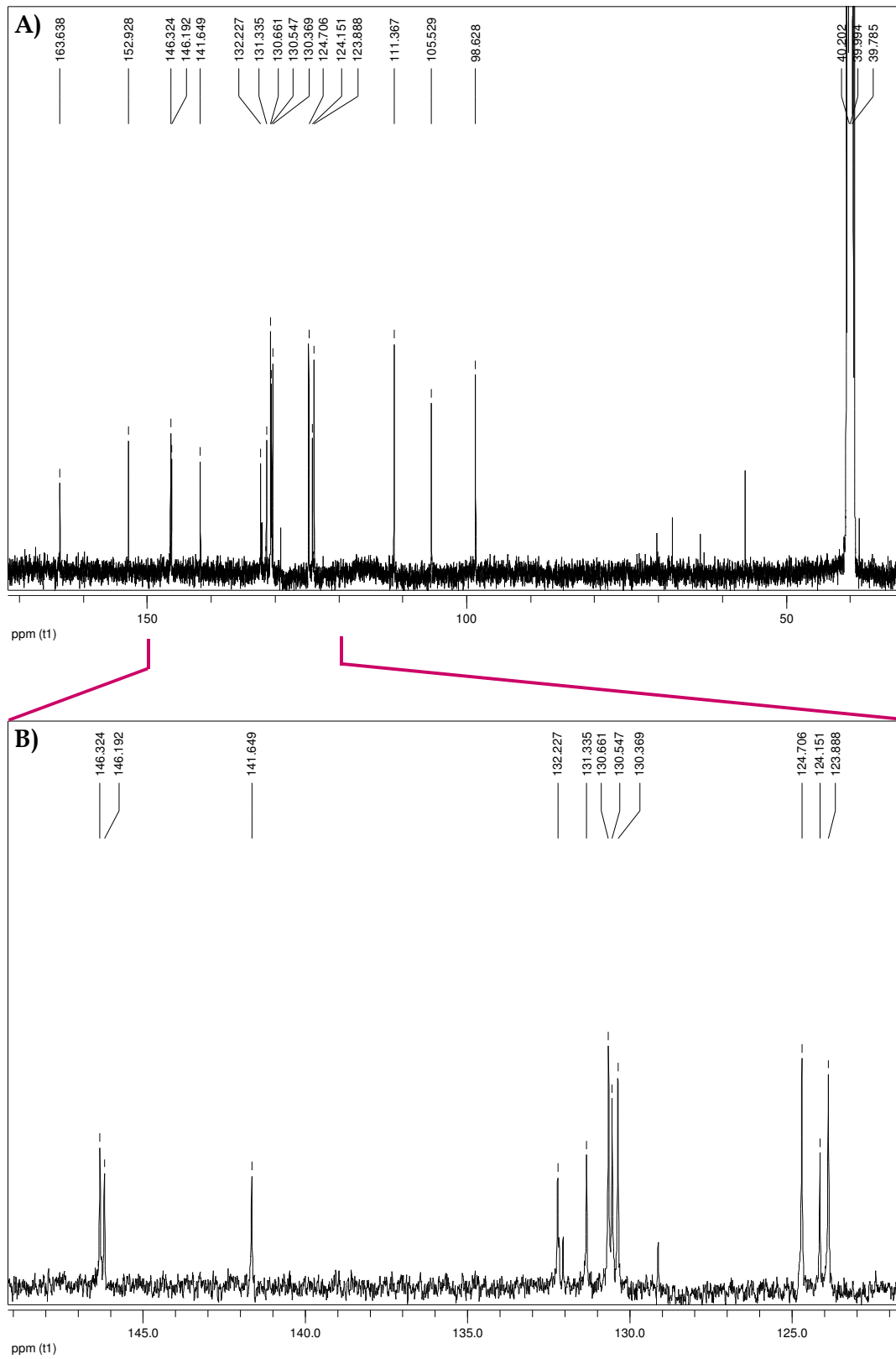
Anexo 2.9: Espectro Infrarrojo de *Neutral Red* monobromado.



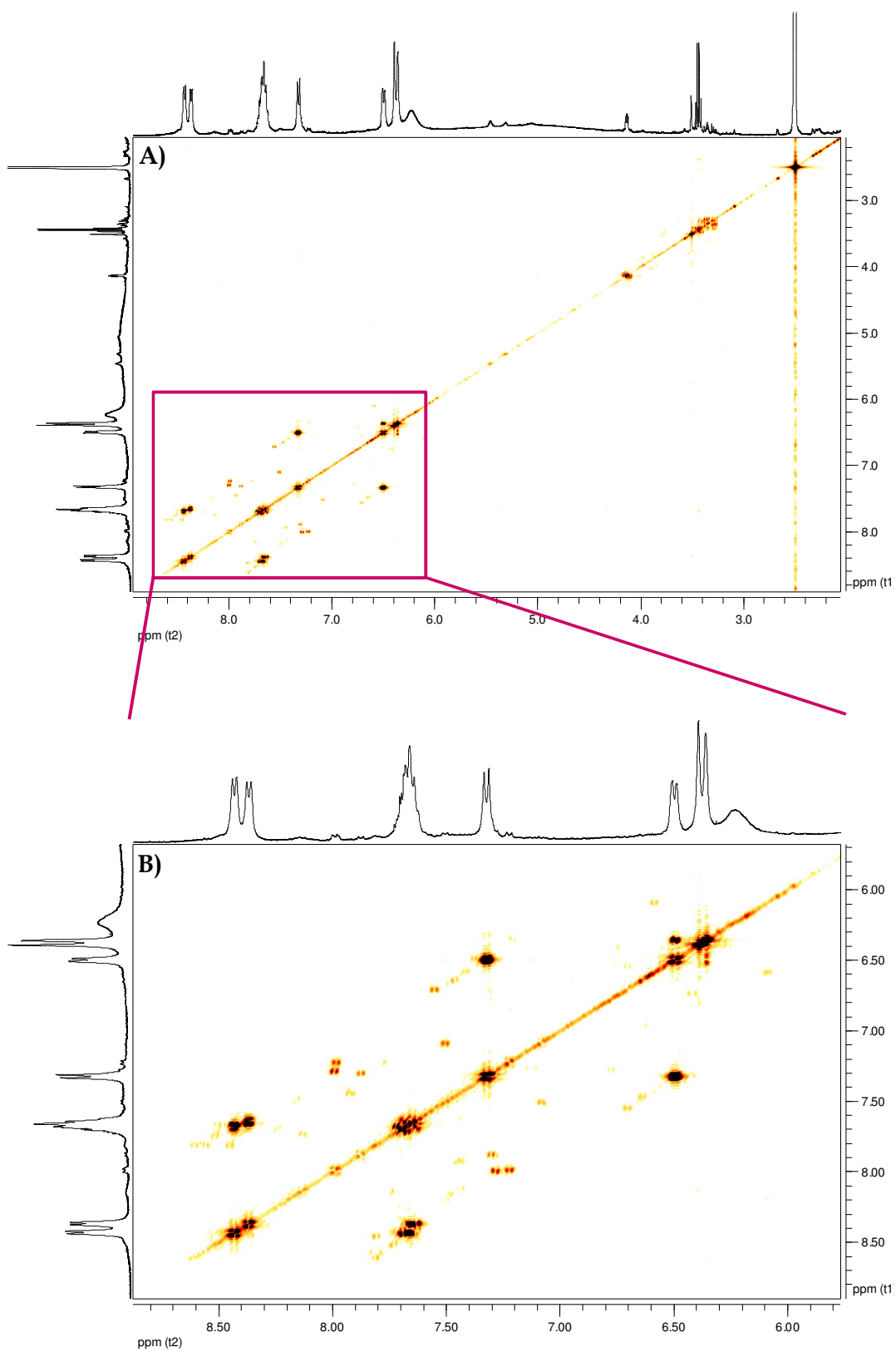
ANEXO 3
CARACTERIZACIÓN DE
CRESYL VIOLET



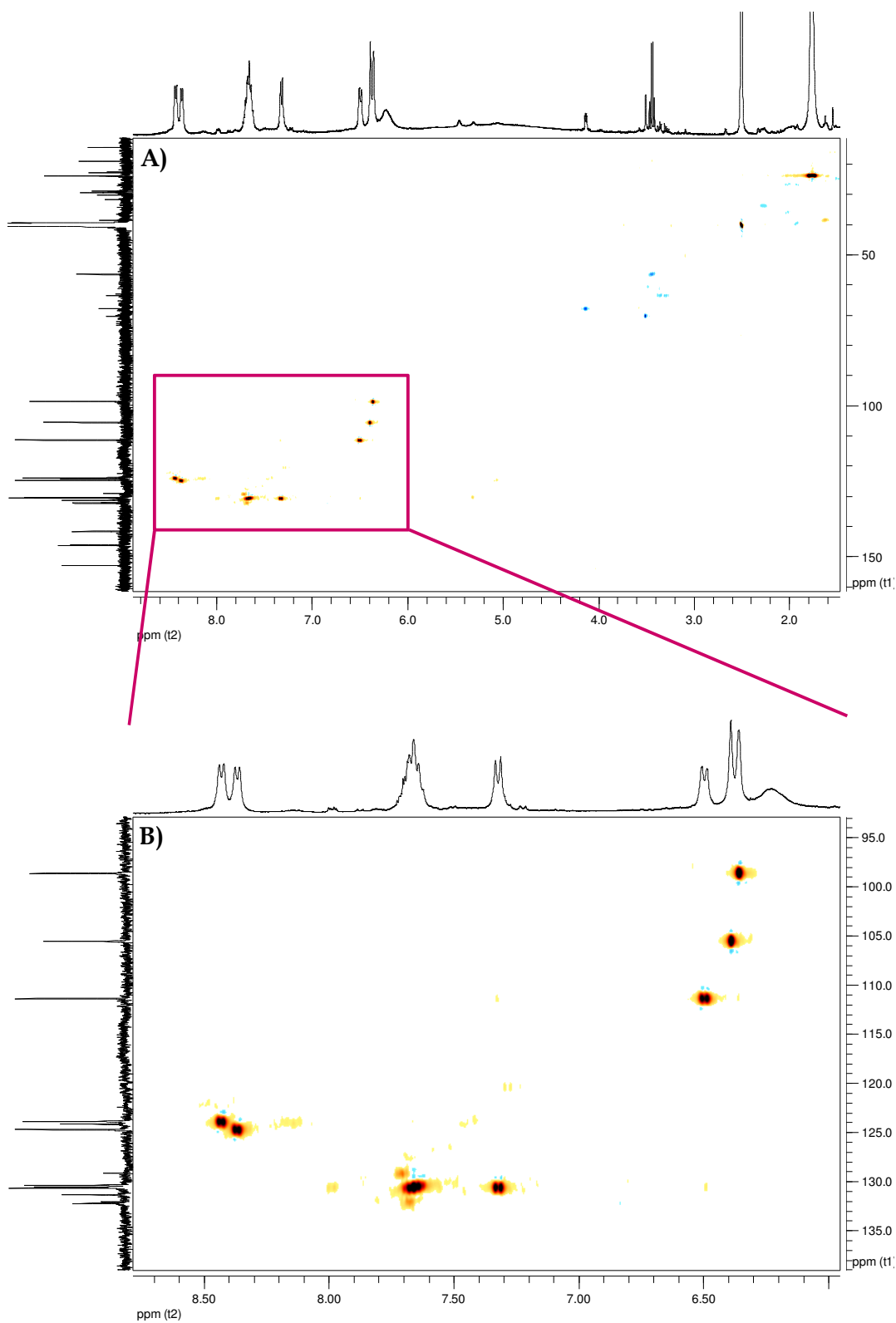
Anexo 3.1: Espectro de RMN- ^1H de *Cresyl Violet*. **A)** Espectro completo; **B)** Espectro ampliado.



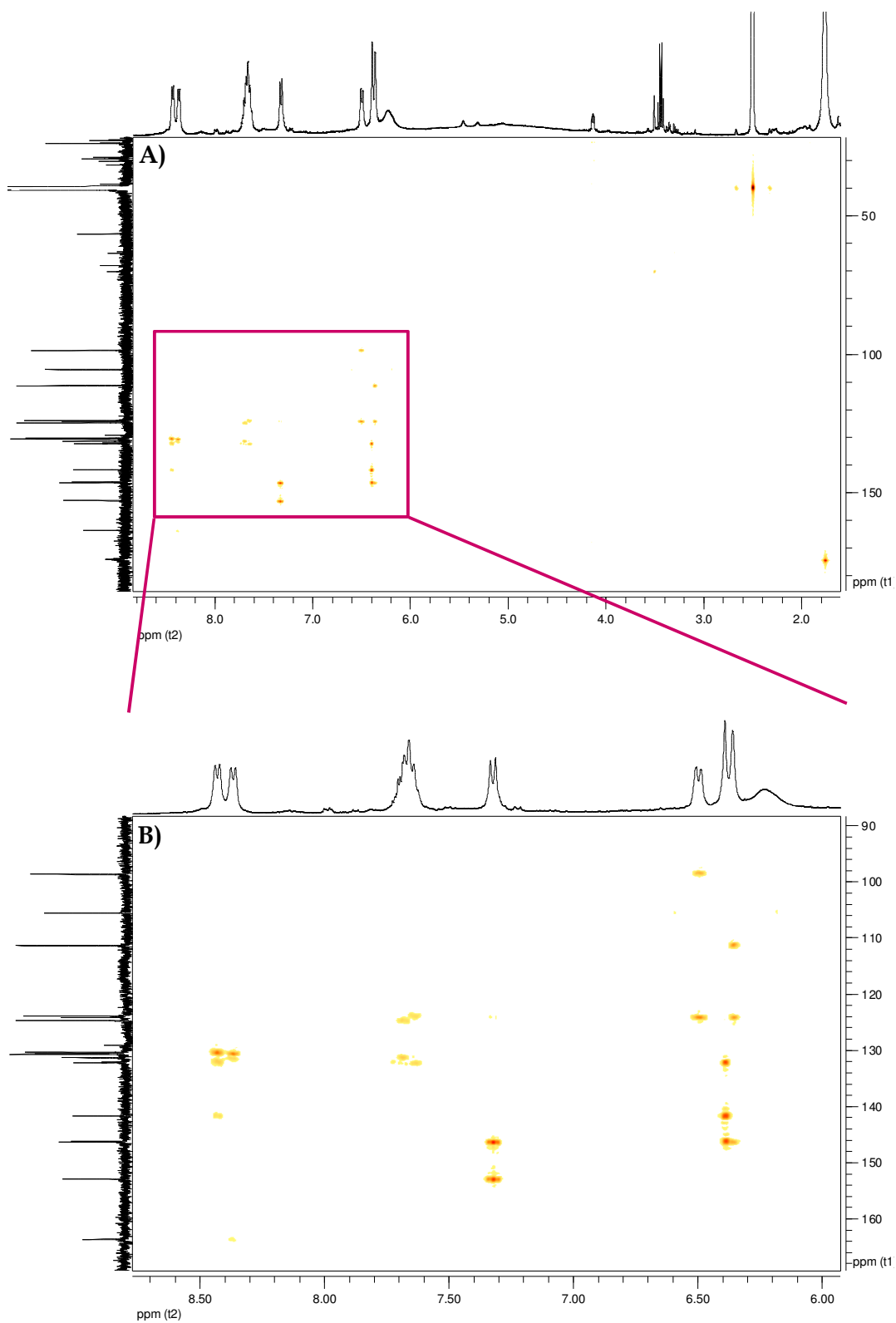
Anexo 3.2: Espectro de RMN- ^{13}C de *Cresyl Violet*. **A)** Espectro completo; **B)** Espectro ampliado.



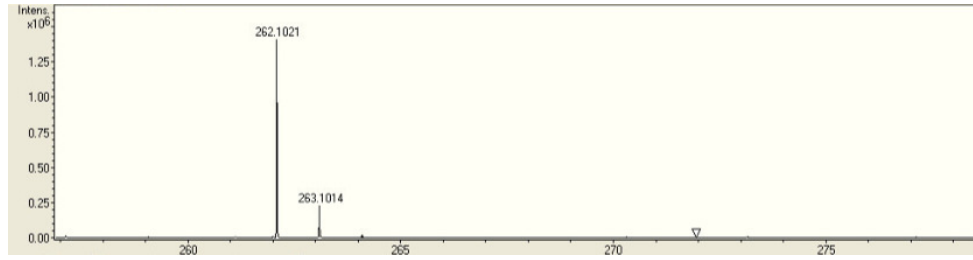
Anexo 3.3: Espectro de *Cresyl Violet* obtenido de experimentos COSY. **A)** Espectro completo; **B)** Espectro ampliado.



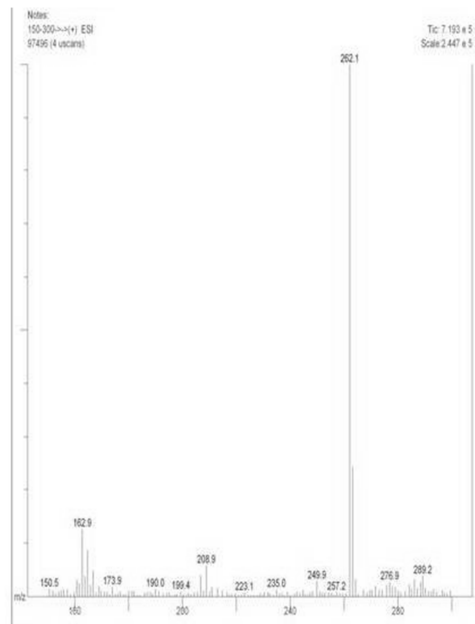
Anexo 3.4: Espectro de *Cresyl Violet* obtenido de experimentos HSQC. A) Espectro completo; B) Espectro ampliado.



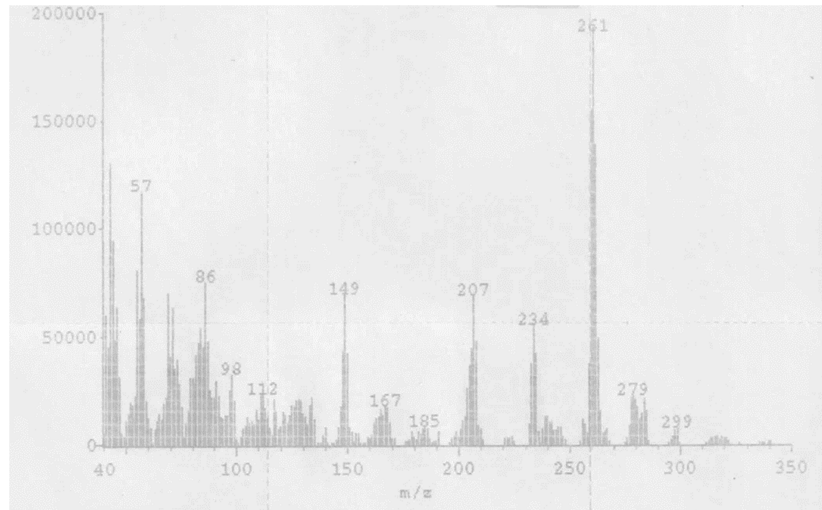
Anexo 3.5: Espectro de *Cresyl Violet* obtenido de experimentos HMBC. **A)** Espectro completo; **B)** Espectro ampliado.



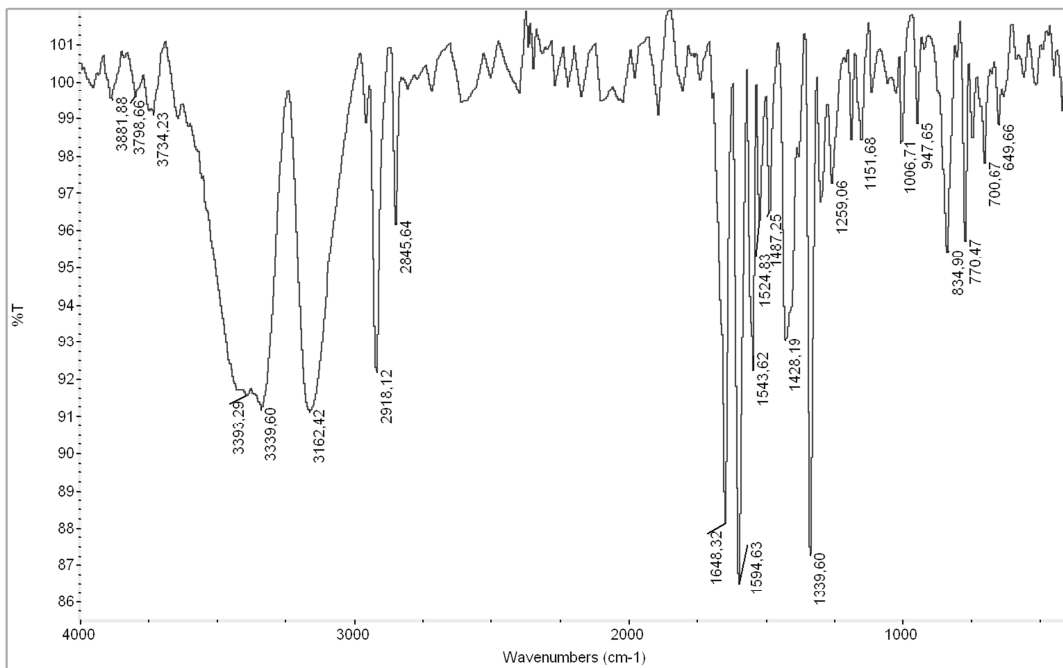
Anexo 3.6: Espectro de Masa de Alta Resolución ESI-micro QTOF de *Cresyl Violet*.



Anexo 3.7: Espectro de masa de ionización por electrospray de *Cresyl Violet*.



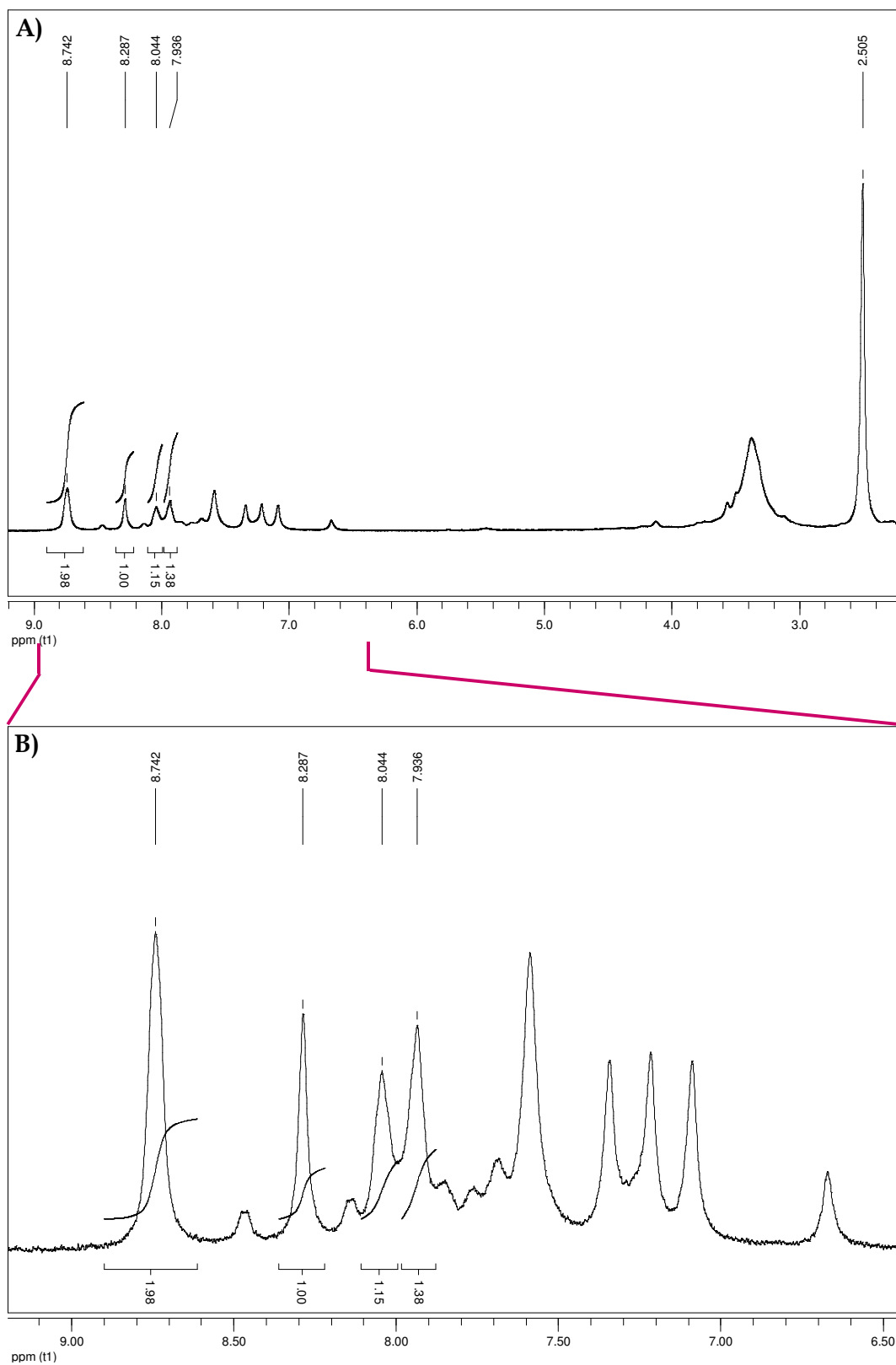
Anexo 3.8: Espectro de masa de impacto electrónico de *Cresyl Violet*.



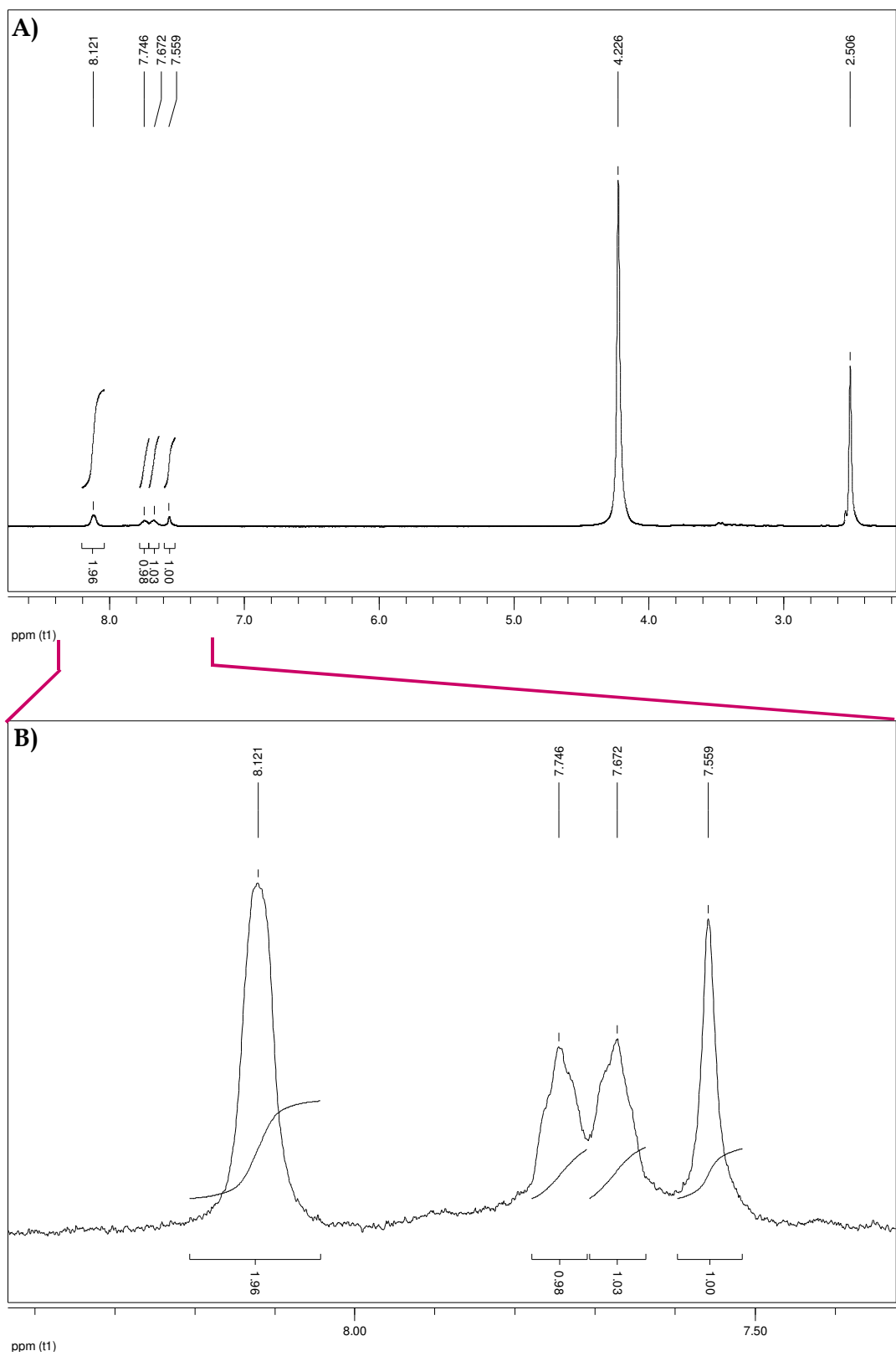
Anexo 3.9: Espectro Infrarrojo de *Cresyl Violet*.



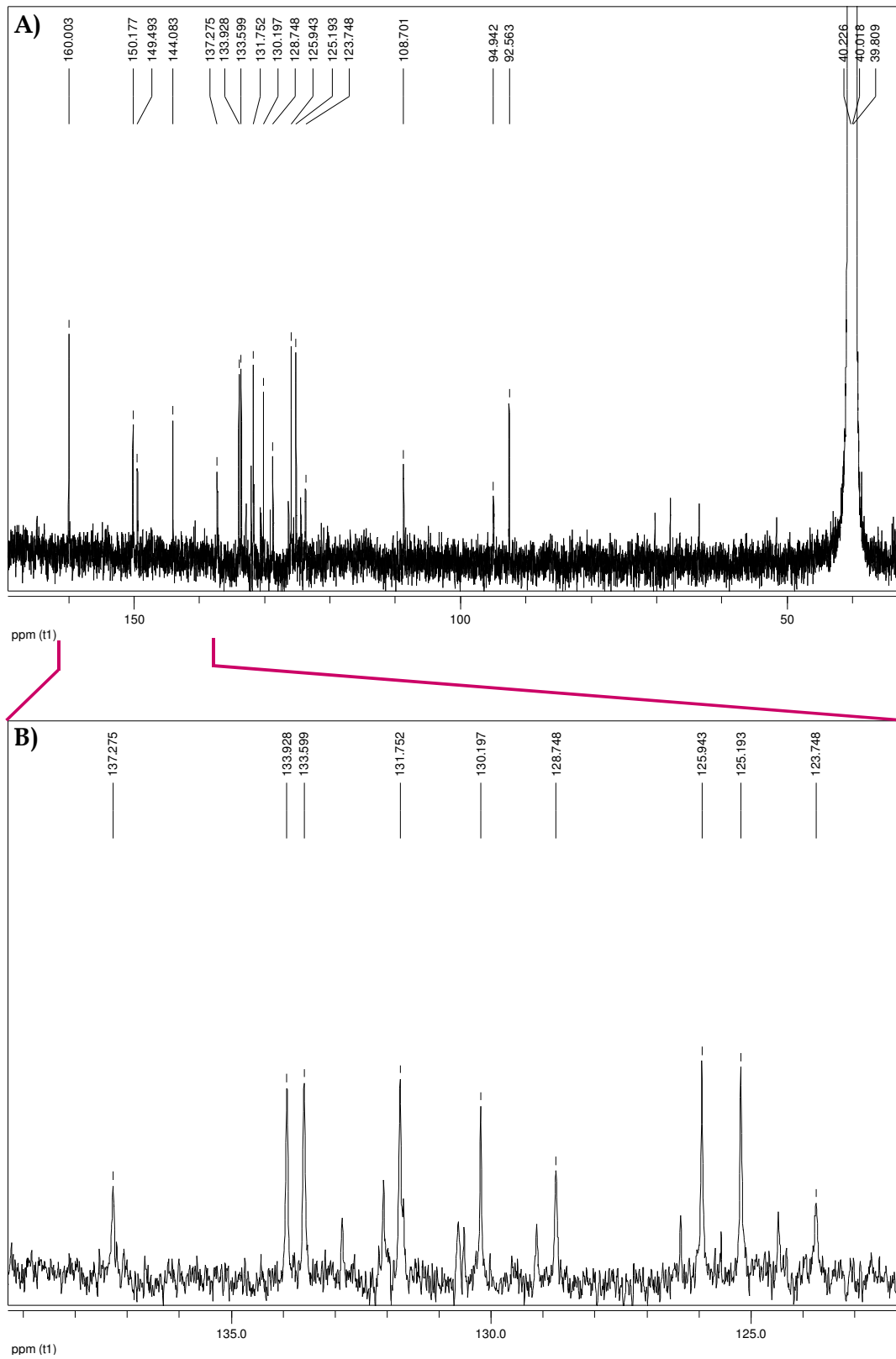
ANEXO 4
CARACTERIZACIÓN DE
CRESYL VIOLET TRIBROMADO



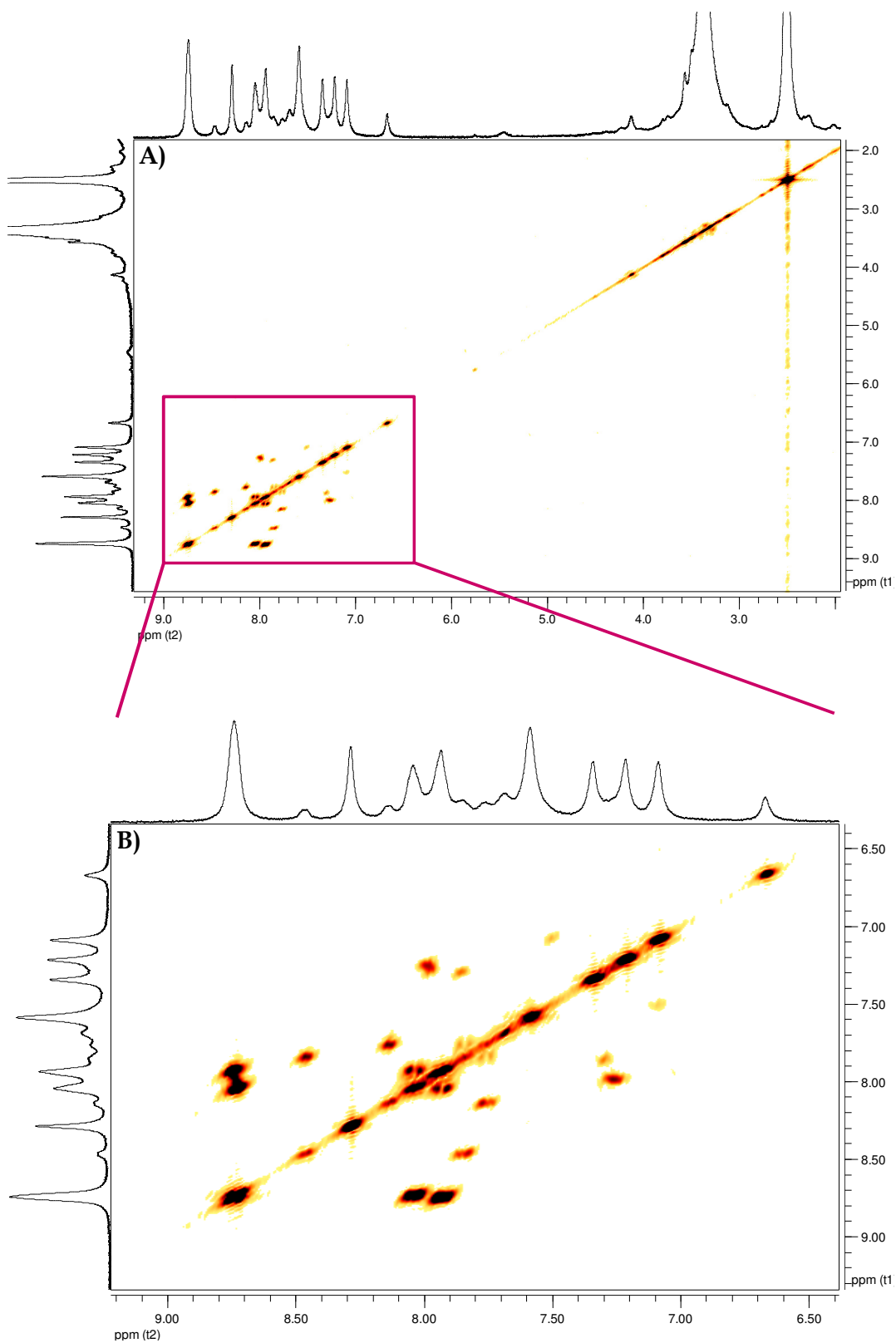
Anexo 4.1: Espectro de RMN- ^1H de *Cresyl Violet* tribromado. **A)** Espectro completo; **B)** Espectro ampliado.



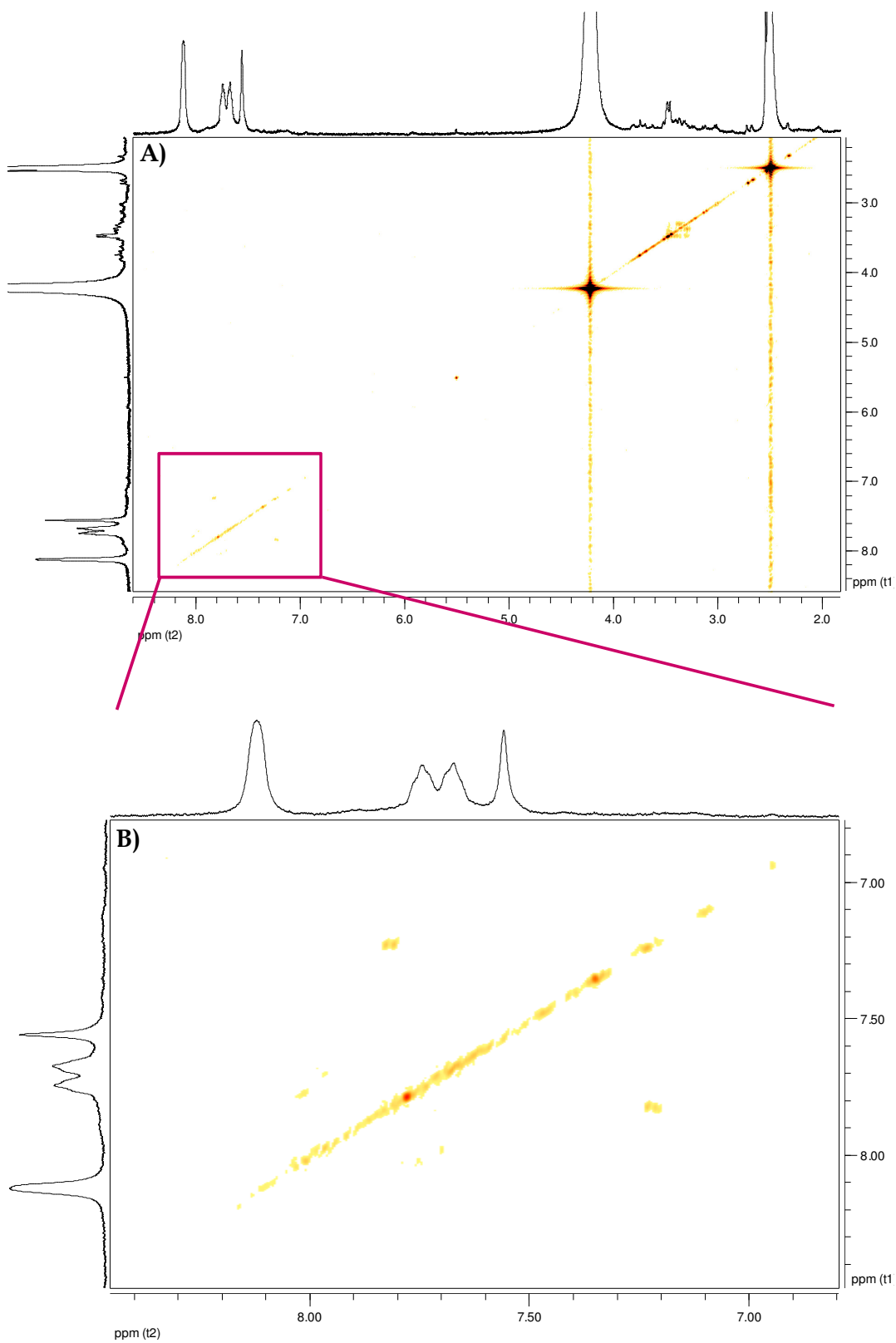
Anexo 4.2: Espectro de RMN- ^1H de *Cresyl Violet* tribromado con D_2O . **A)** Espectro completo; **B)** Espectro ampliado.



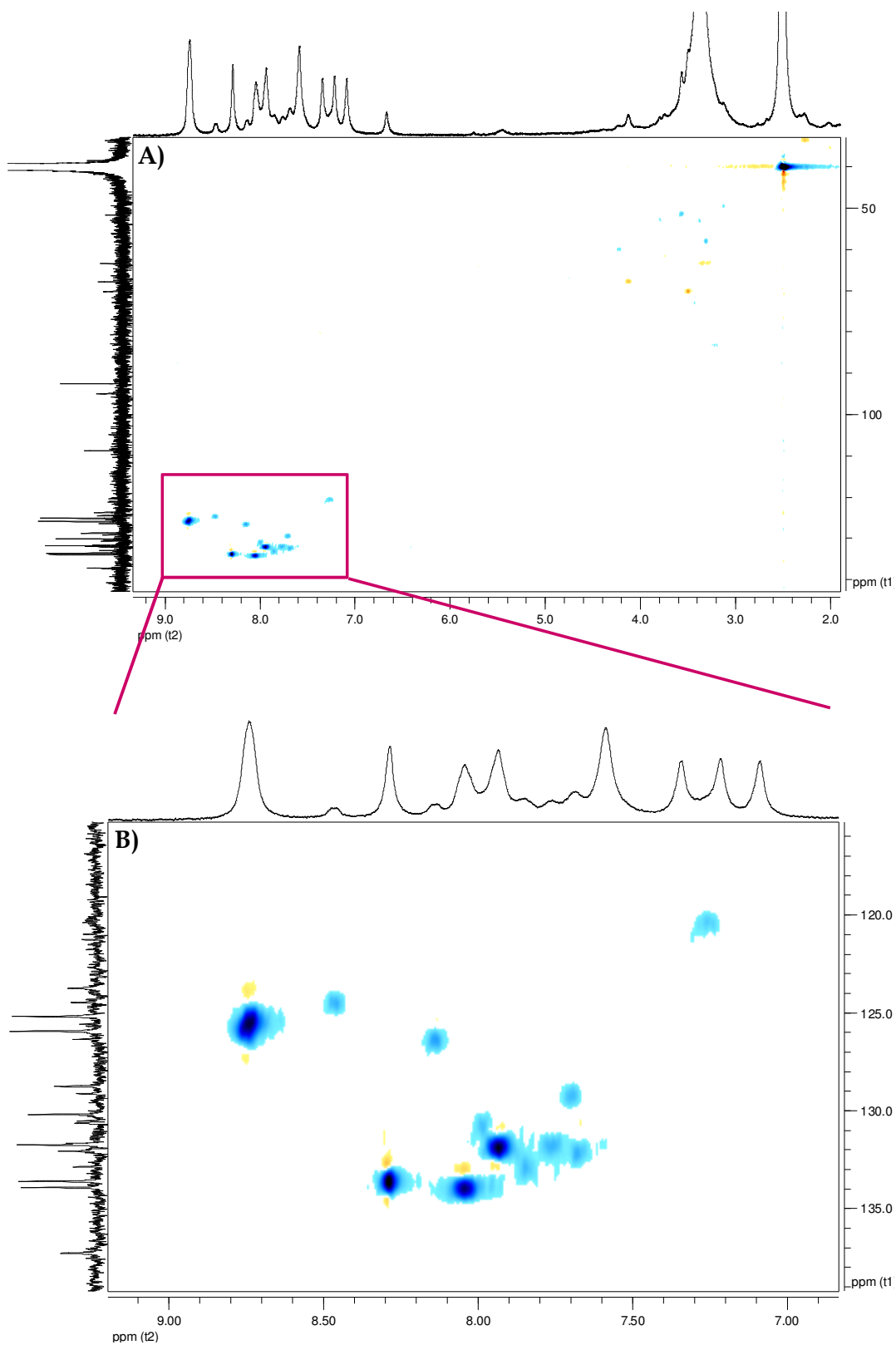
Anexo 4.3: Espectro de RMN- ^{13}C de *Cresyl Violet* tribromado. **A)** Espectro completo; **B)** Espectro ampliado.



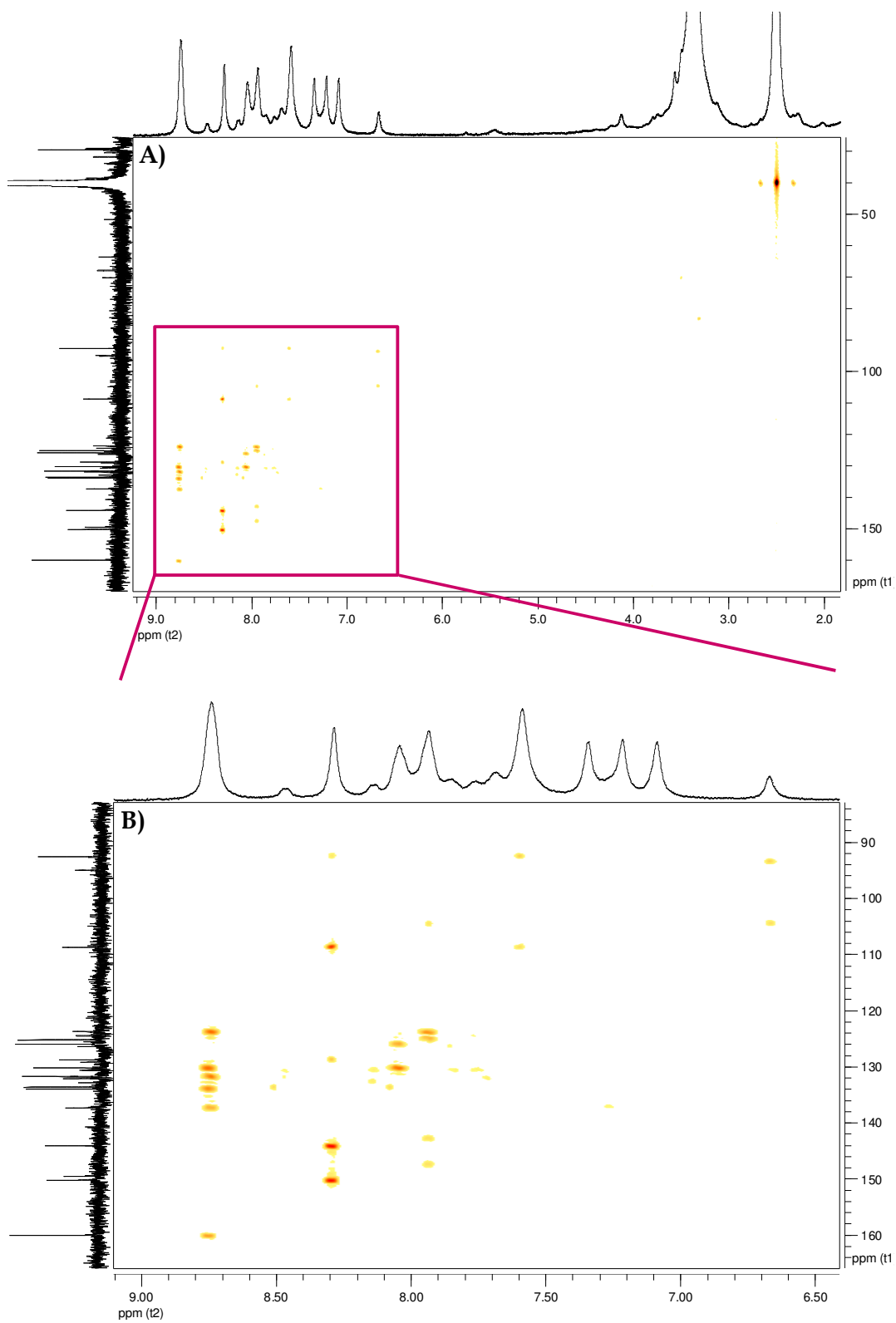
Anexo 4.4: Espectro de *Cresyl Violet* tribromado obtenido de experimentos COSY. **A)** Espectro completo; **B)** Espectro ampliado.



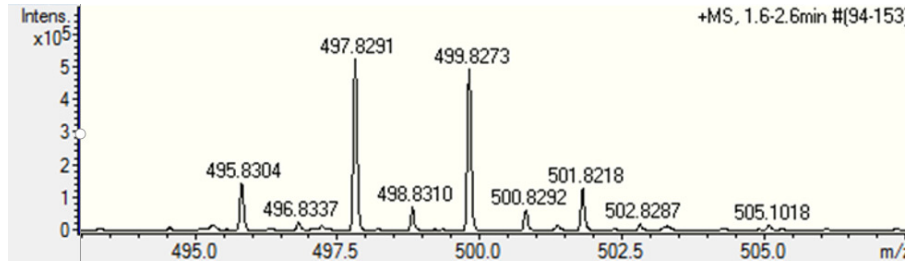
Anexo 4.5: Espectro de *Cresyl Violet* tribromado con D₂O obtenido de experimentos COSY. **A)** Espectro completo; **B)** Espectro ampliado.



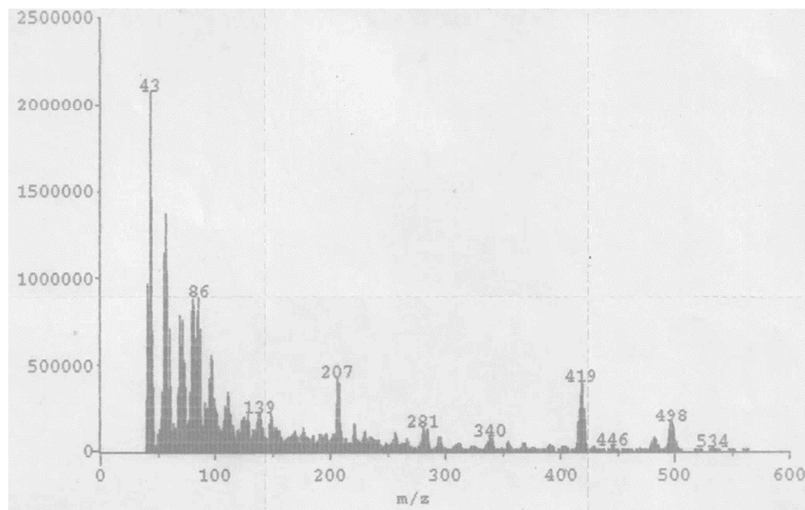
Anexo 4.6: Espectro de *Cresyl Violet* tribromado obtenido de experimentos HSQC. **A)** Espectro completo; **B)** Espectro ampliado.



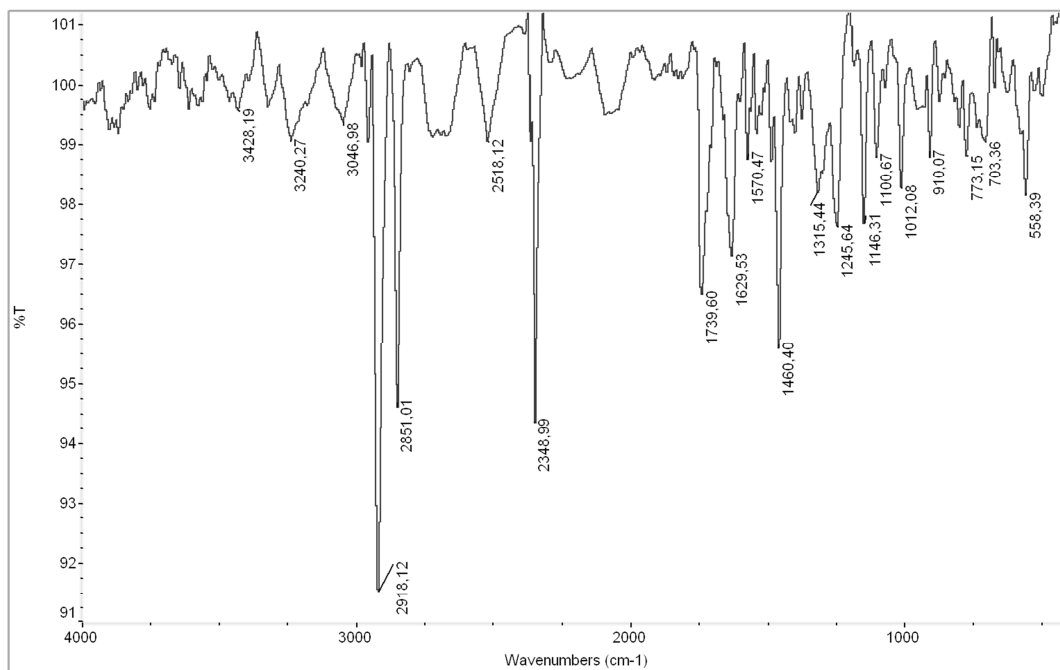
Anexo 4.7: Espectro de *Cresyl Violet* tribromado obtenido de experimentos HMBC. A) Espectro completo; B) Espectro ampliado.



Anexo 4.8: Espectro de Masa de Alta Resolución ESI-micro QTOF de *Cresyl Violet* tribromado.



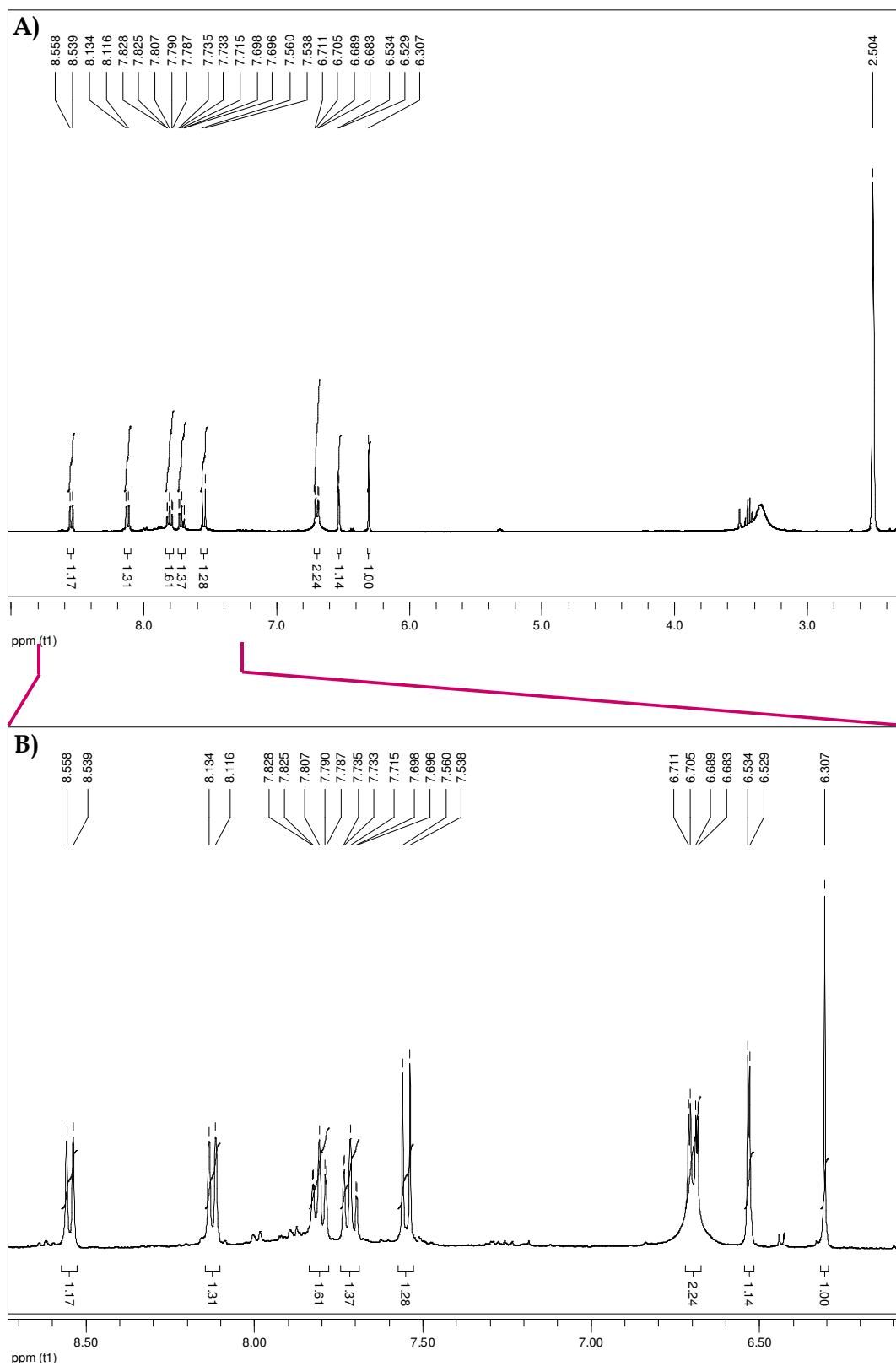
Anexo 4.9: Espectro de masa de impacto electrónico de *Cresyl Violet* tribromado.



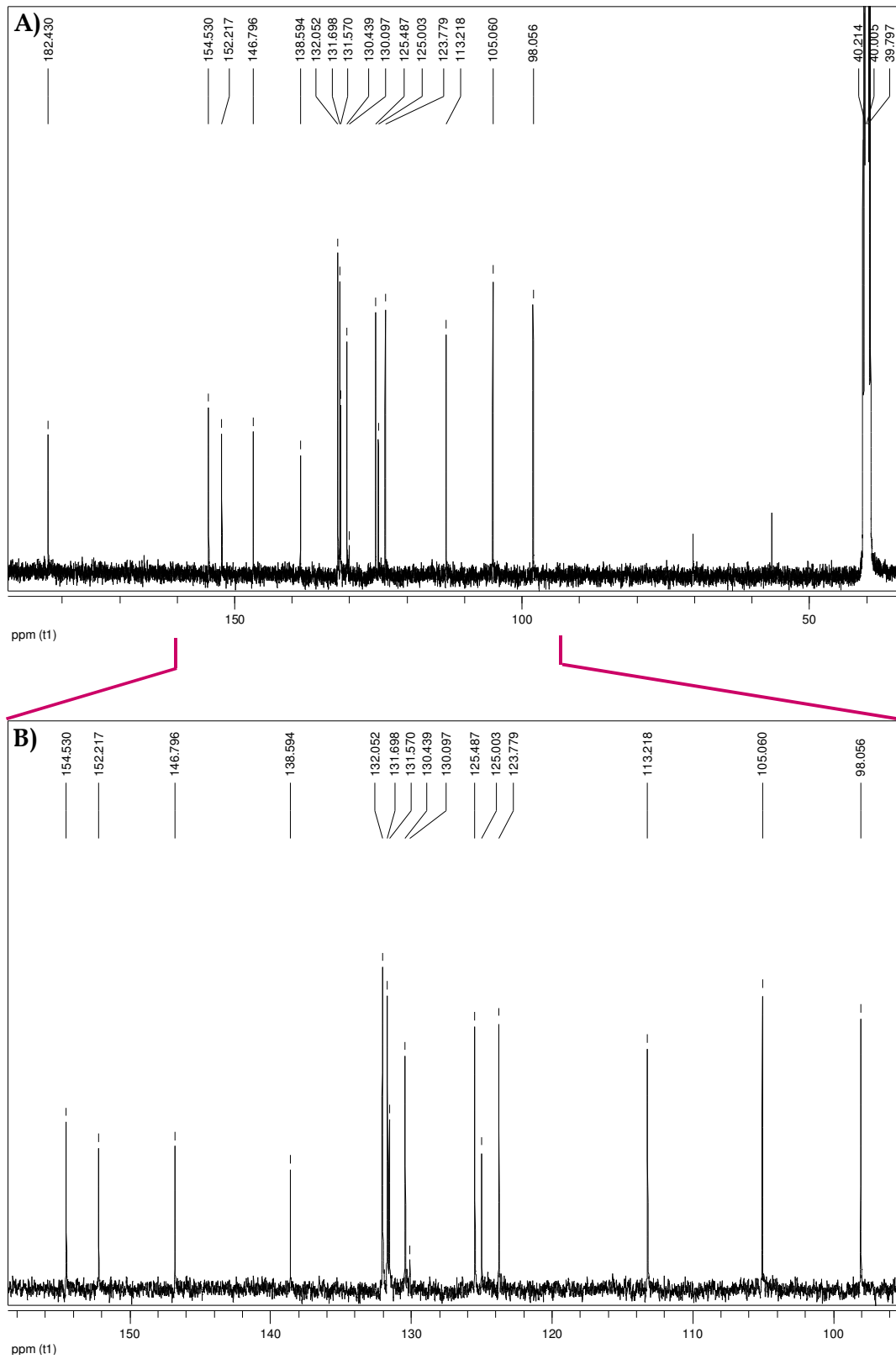
Anexo 4.10: Espectro Infrarrojo de *Cresyl Violet* tribromado.



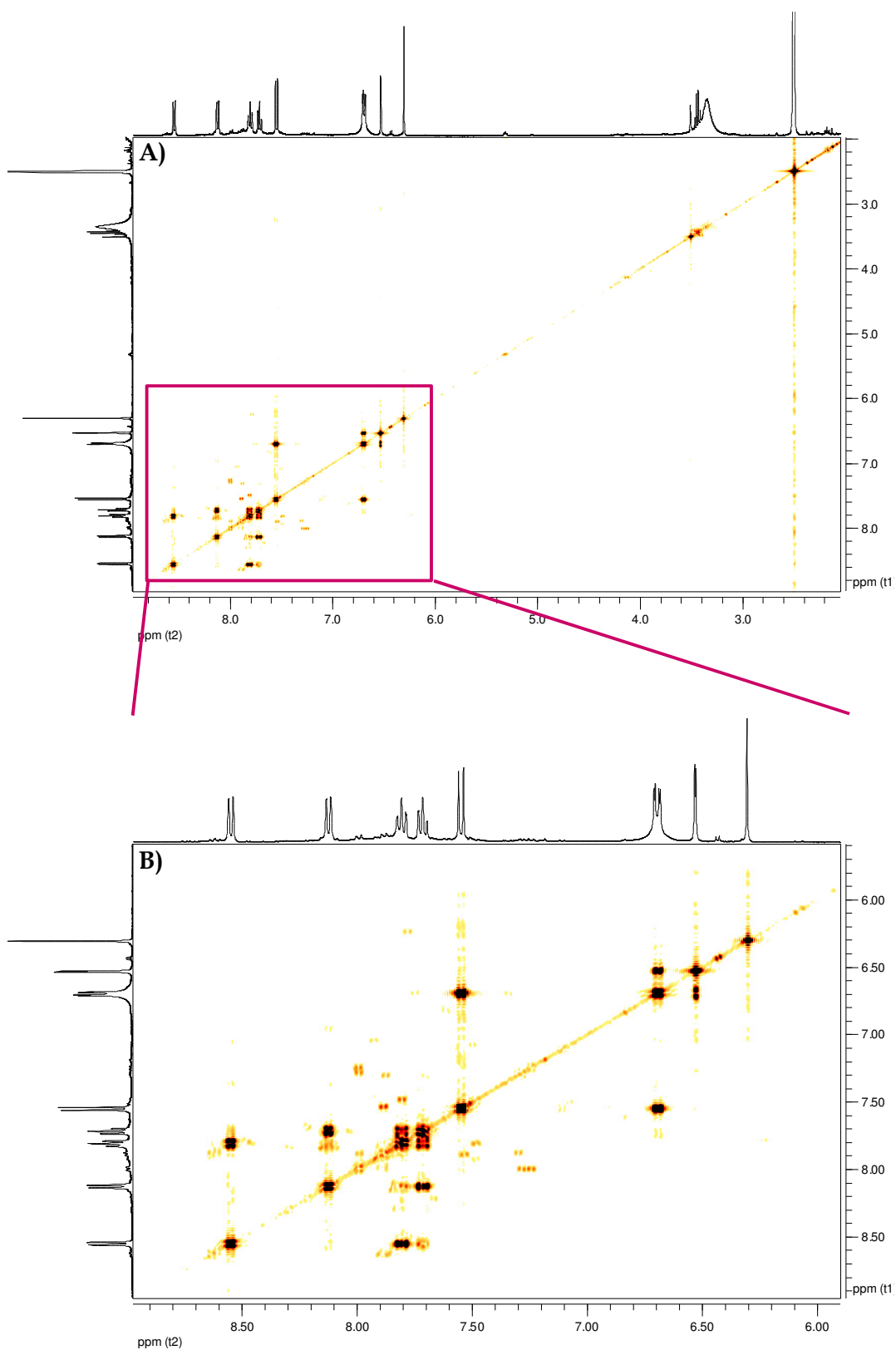
ANEXO 5
CARACTERIZACIÓN DE
CRESYL RED



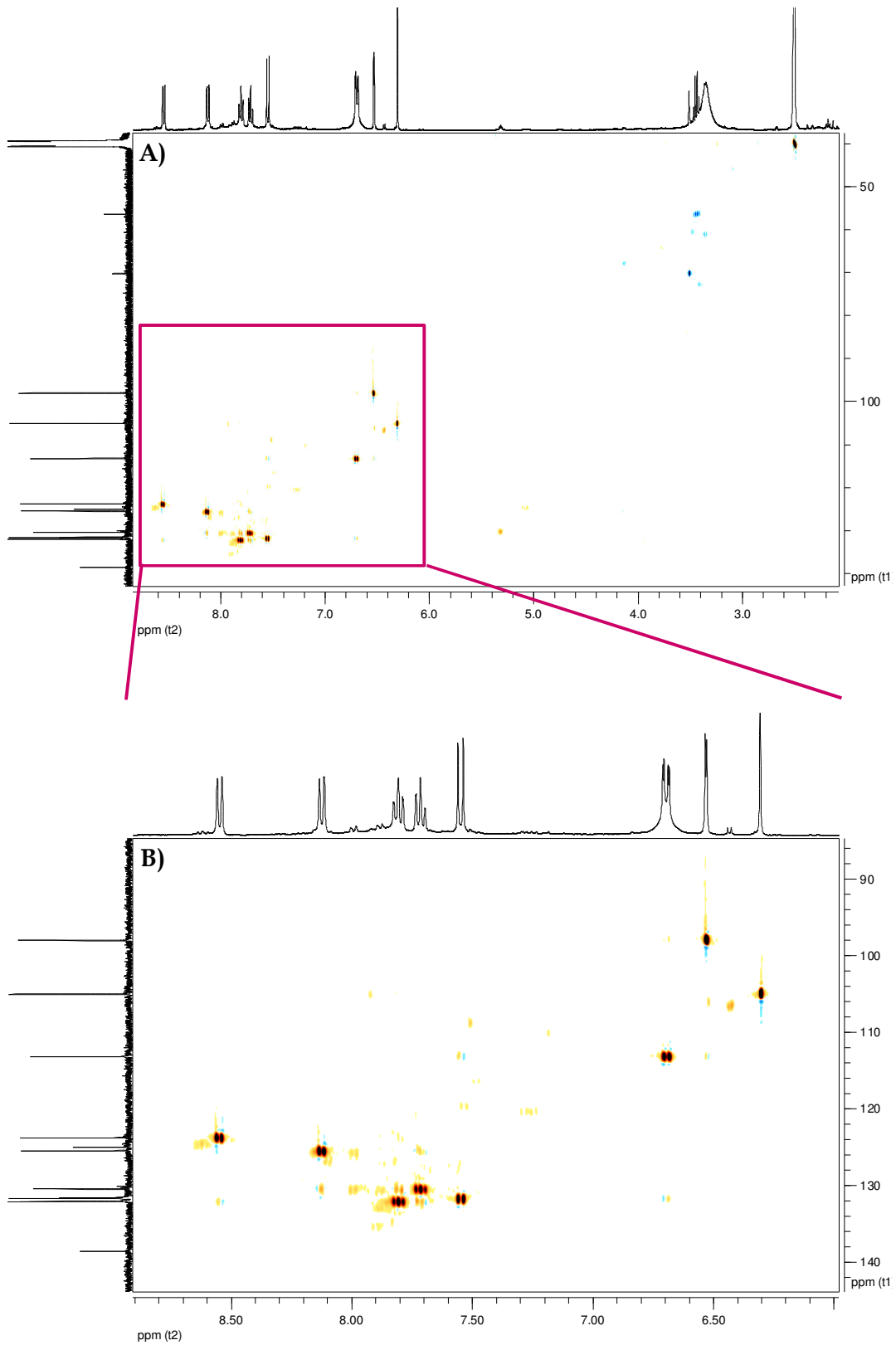
Anexo 5.1: Espectro de RMN- ^1H de *Cresyl Red*. **A)** Espectro completo; **B)** Espectro ampliado.



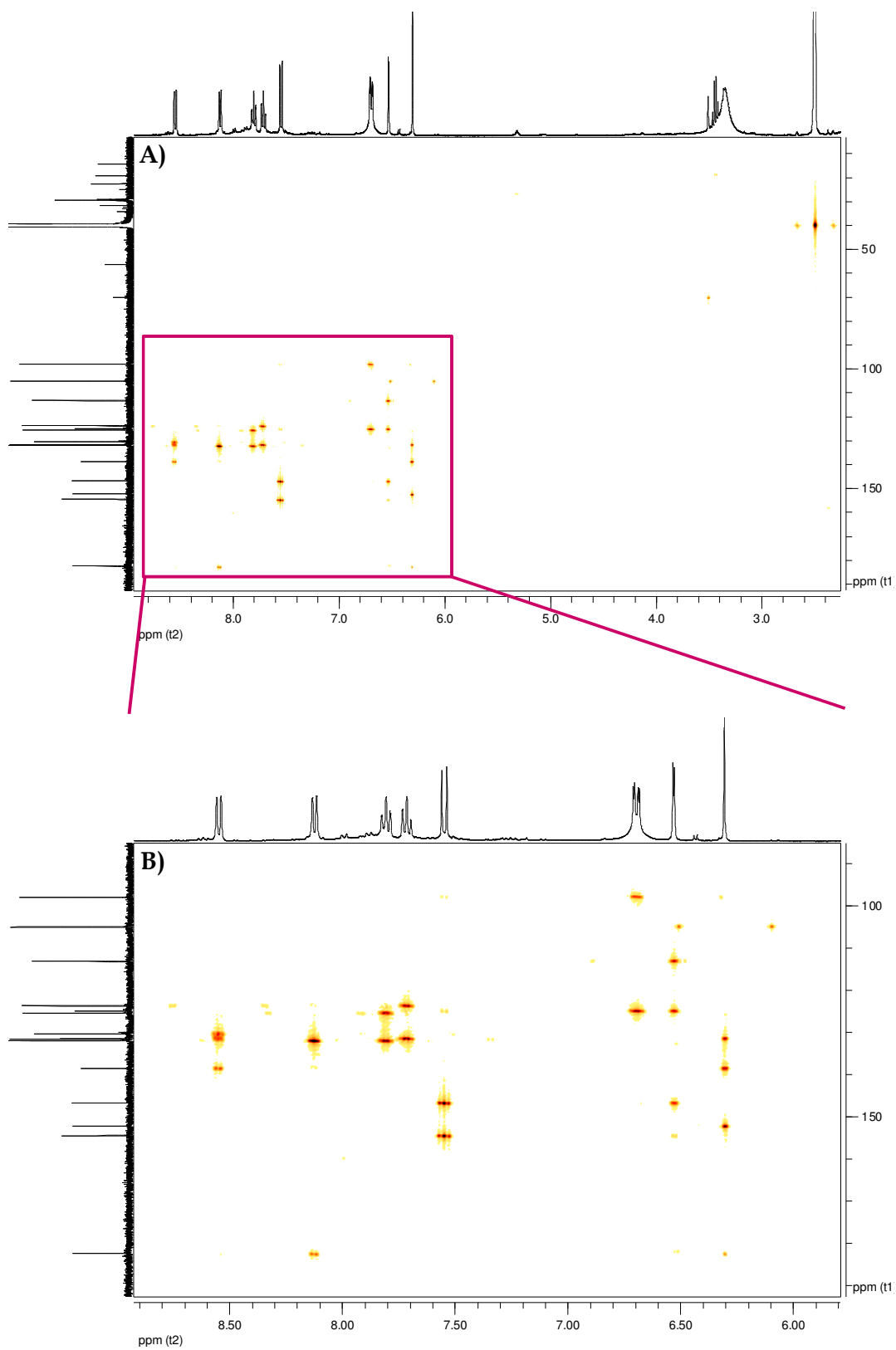
Anexo 5.2: Espectro de RMN-¹³C de *Cresyl Red*. A) Espectro completo; B) Espectro ampliado.



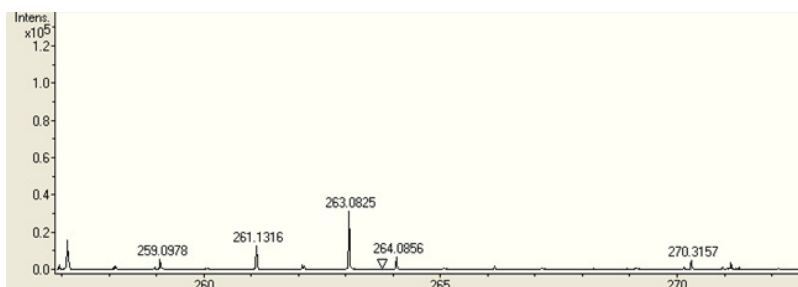
Anexo 5.3: Espectro de *Cresyl Red* obtenido de experimentos COSY. **A)** Espectro completo; **B)** Espectro ampliado.



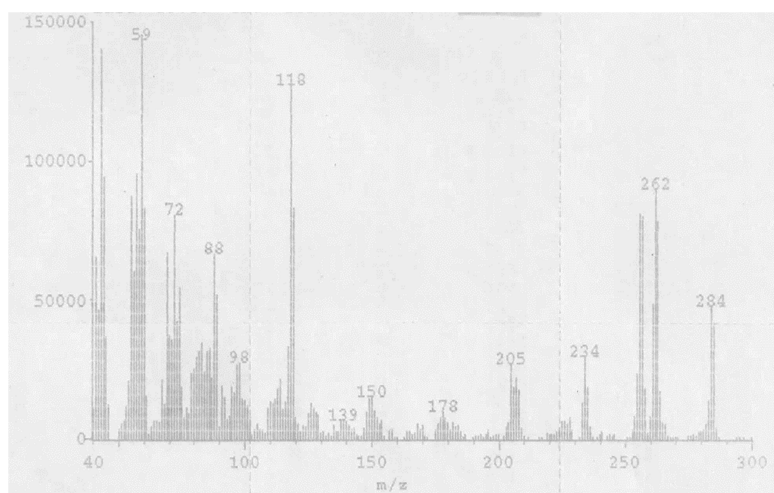
Anexo 5.4: Espectro de *Cresyl Red* obtenido de experimentos HSQC. **A)** Espectro completo; **B)** Espectro ampliado.



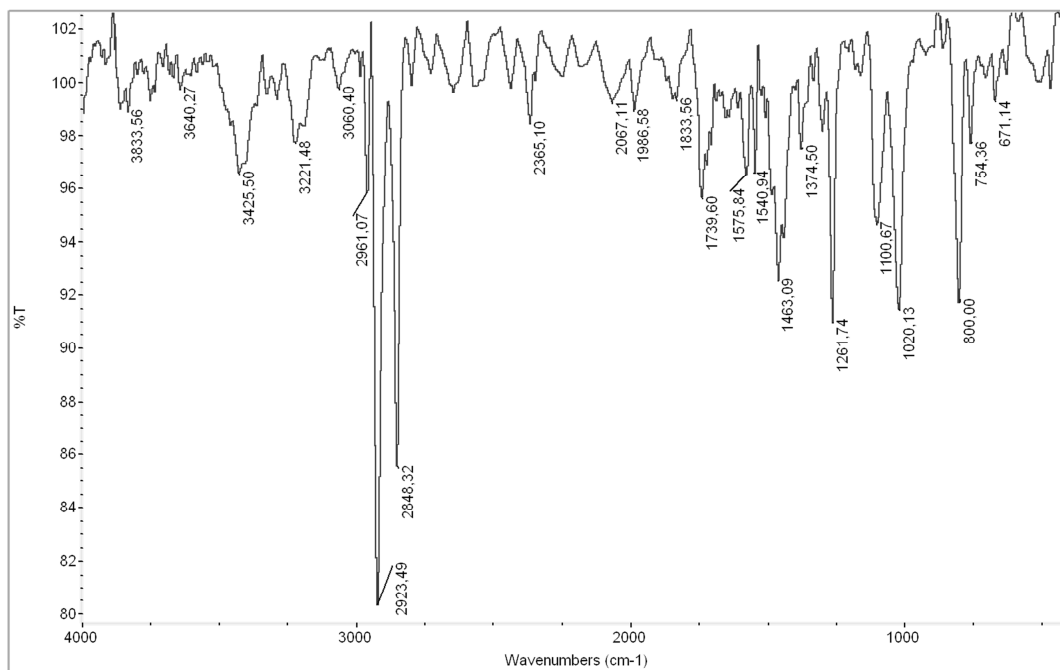
Anexo 5.5: Espectro de *Cresyl Red* obtenido de experimentos HMBC. **A)** Espectro completo; **B)** Espectro ampliado.



Anexo 5.6: Espectro de Masa de Alta Resolución ESI-micro QTOF de *Cresyl Red*.



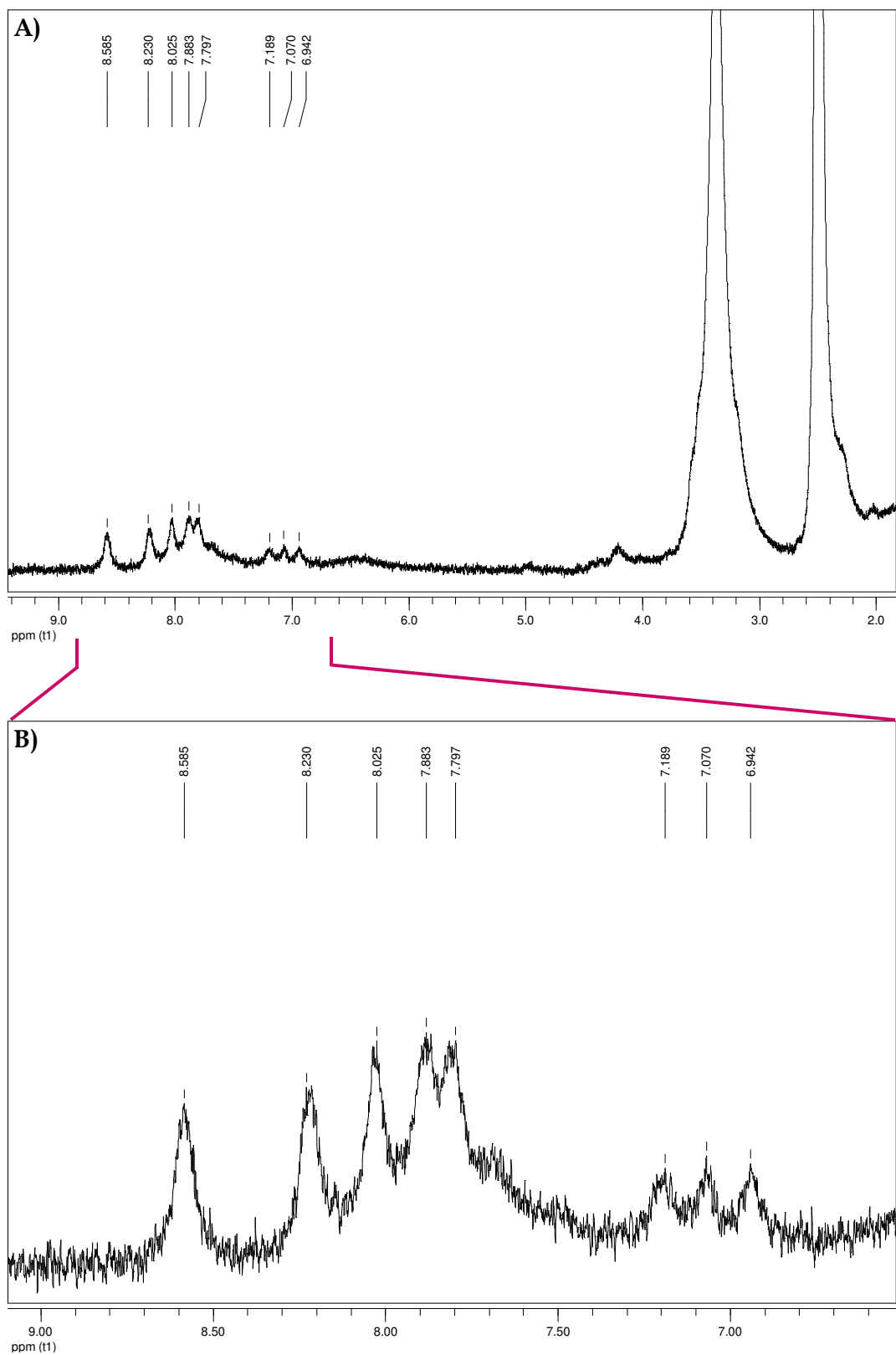
Anexo 5.7: Espectro de masa de impacto electrónico de *Cresyl Red*.



Anexo 5.8: Espectro Infrarrojo de Cresyl Red.

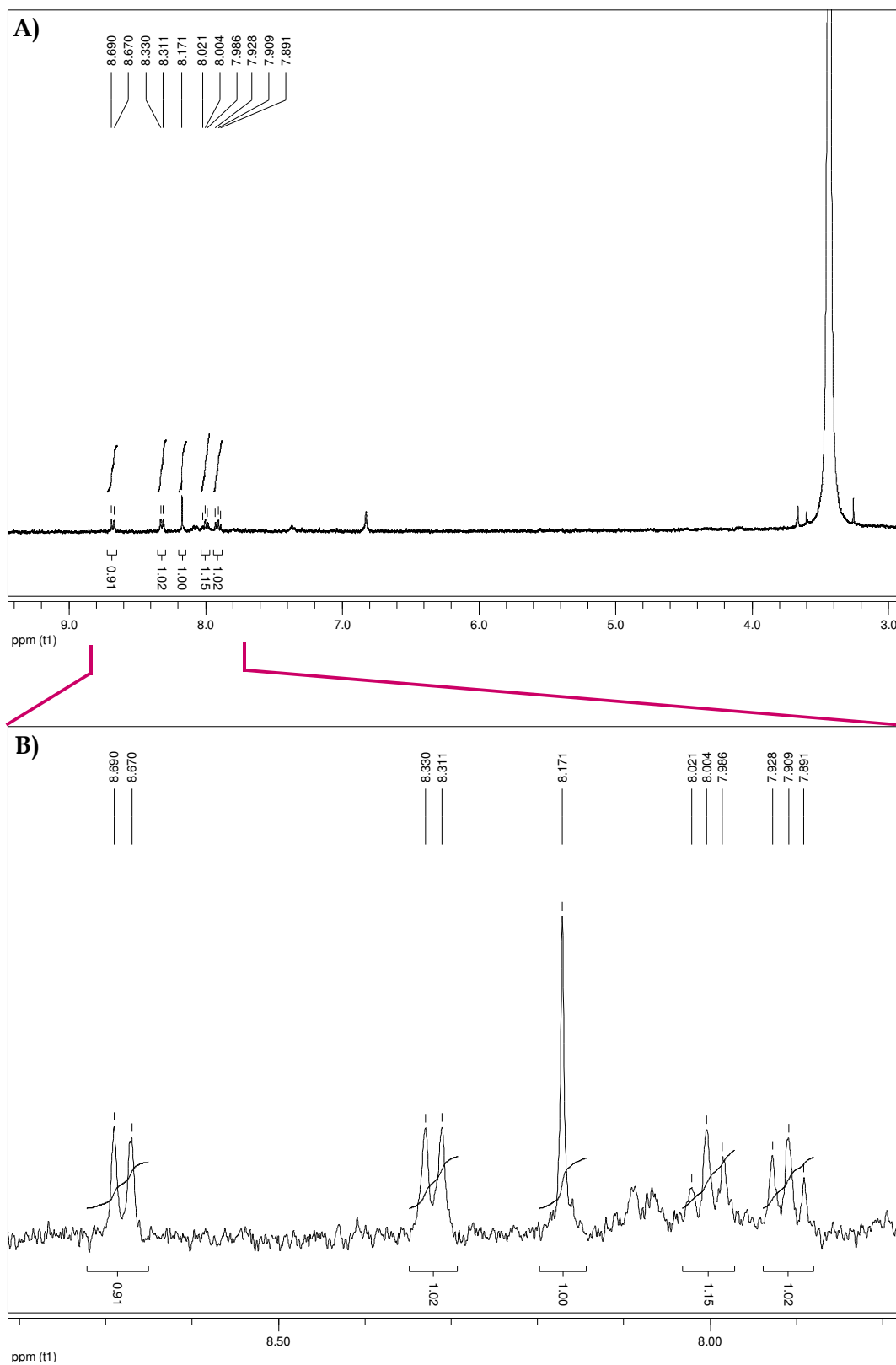


ANEXO 6
CARACTERIZACIÓN DE
CRESYL RED TRIBROMADO

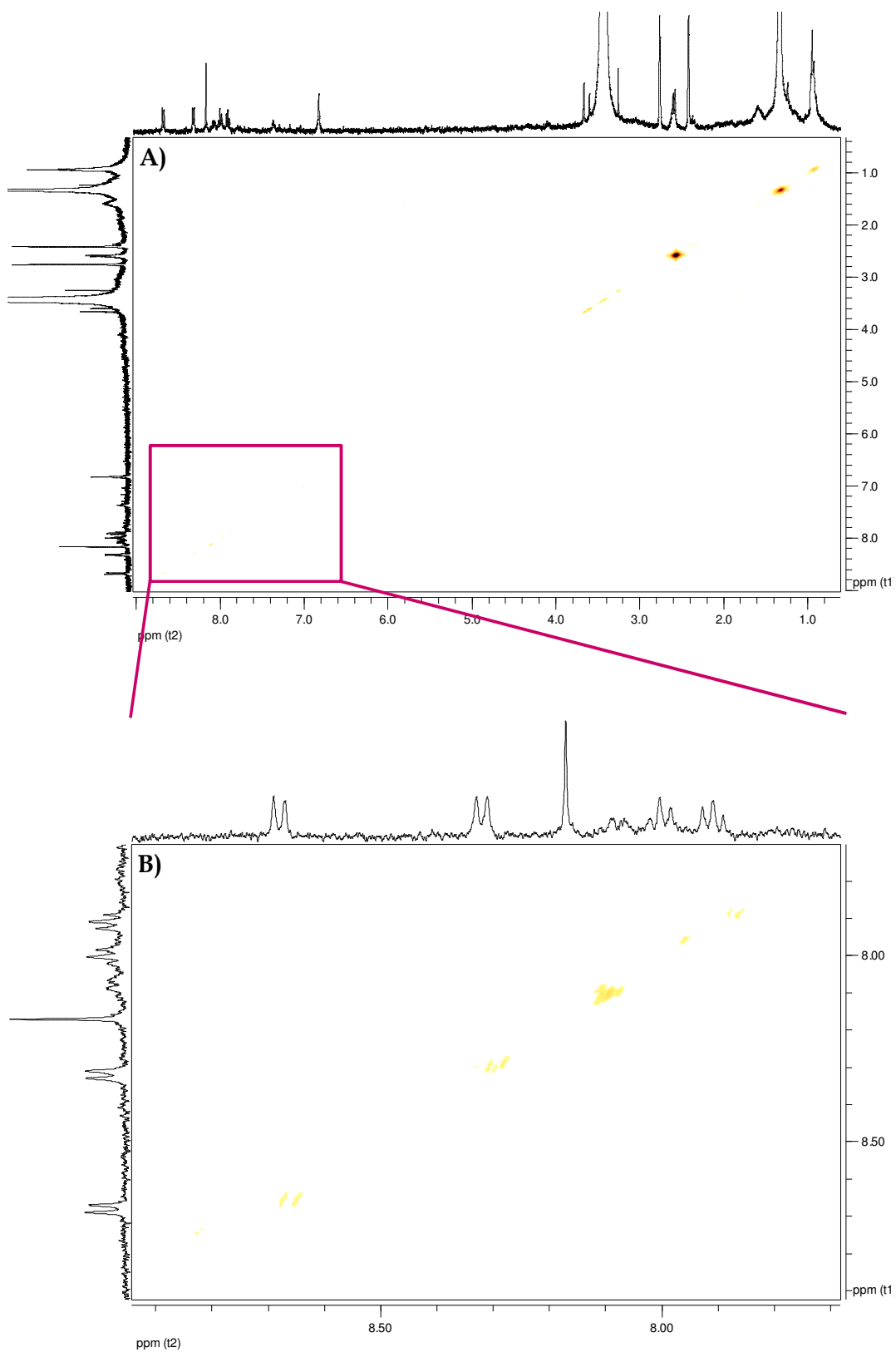


Anexo 6.1: Espectro de RMN- ^1H de *Cresyl Red* tribromado en DMSO-d_6 a 67°C .

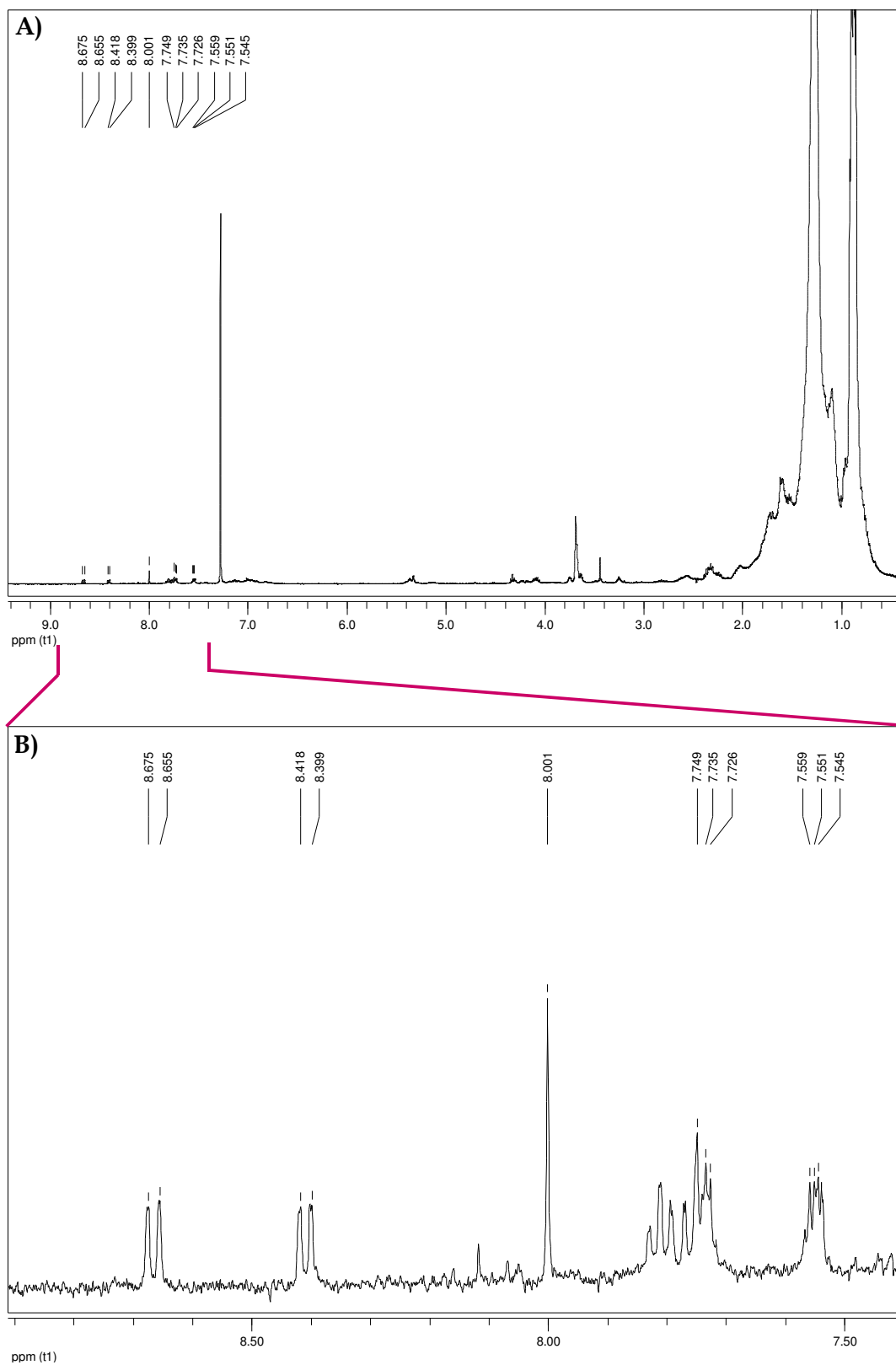
A) Espectro completo; **B)** Espectro ampliado.



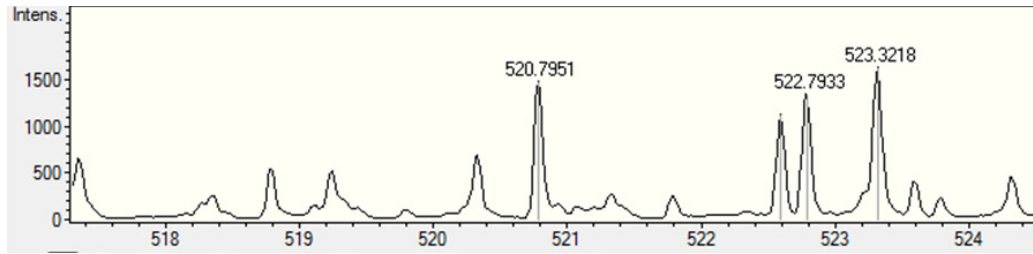
Anexo 6.2: Espectro de *Cresyl Red* tribromado obtenido de experimentos PRESAT en DMSO-d₆ a 47°C. **A)** Espectro completo; **B)** Espectro ampliado.



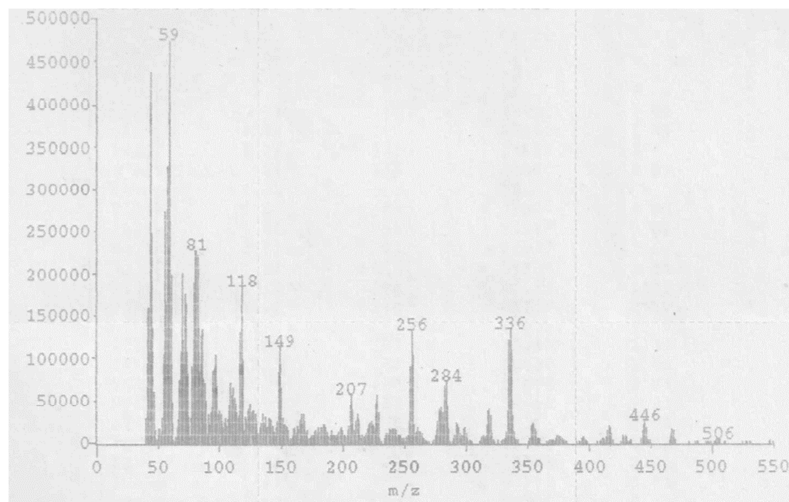
Anexo 6.3: Espectro de *Cresyl Red* tribromado obtenido de experimentos COSY en DMSO- d_6 a 67°C. **A)** Espectro completo; **B)** Espectro ampliado.



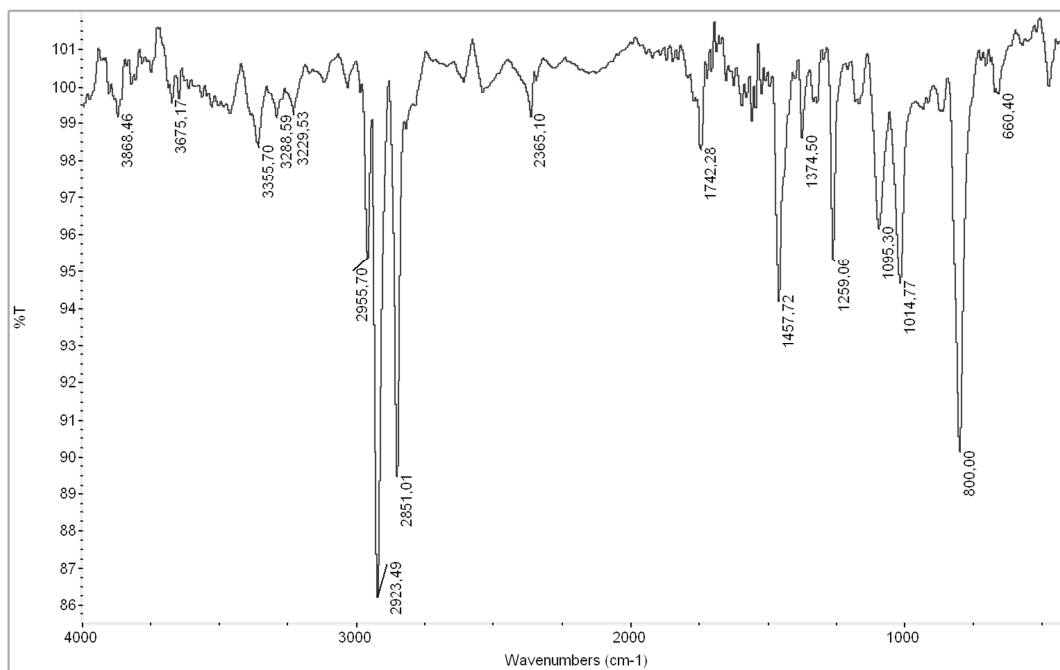
Anexo 6.4: Espectro de RMN-¹H *Cresyl Red* tribromado en CDCl₃. **A)** Espectro completo; **B)** Espectro ampliado.



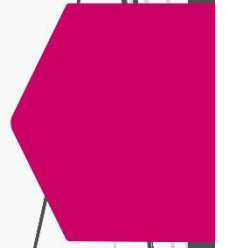
Anexo 6.5: Espectro de Masa de Alta Resolución ESI-micro QTOF de *Cresyl Red* tribromado.



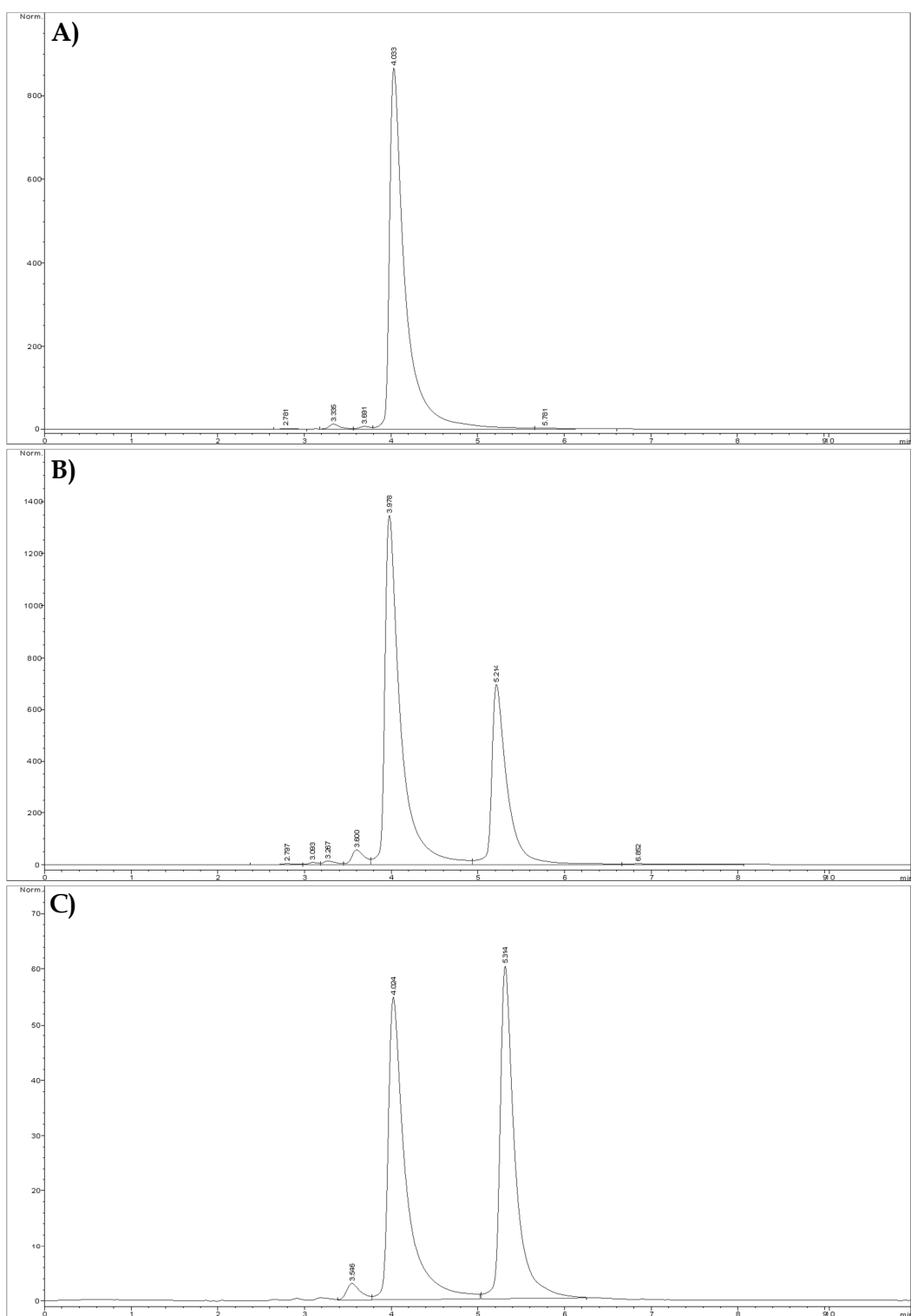
Anexo 6.6: Espectro de masa de impacto electrónico de *Cresyl Red* tribromado.



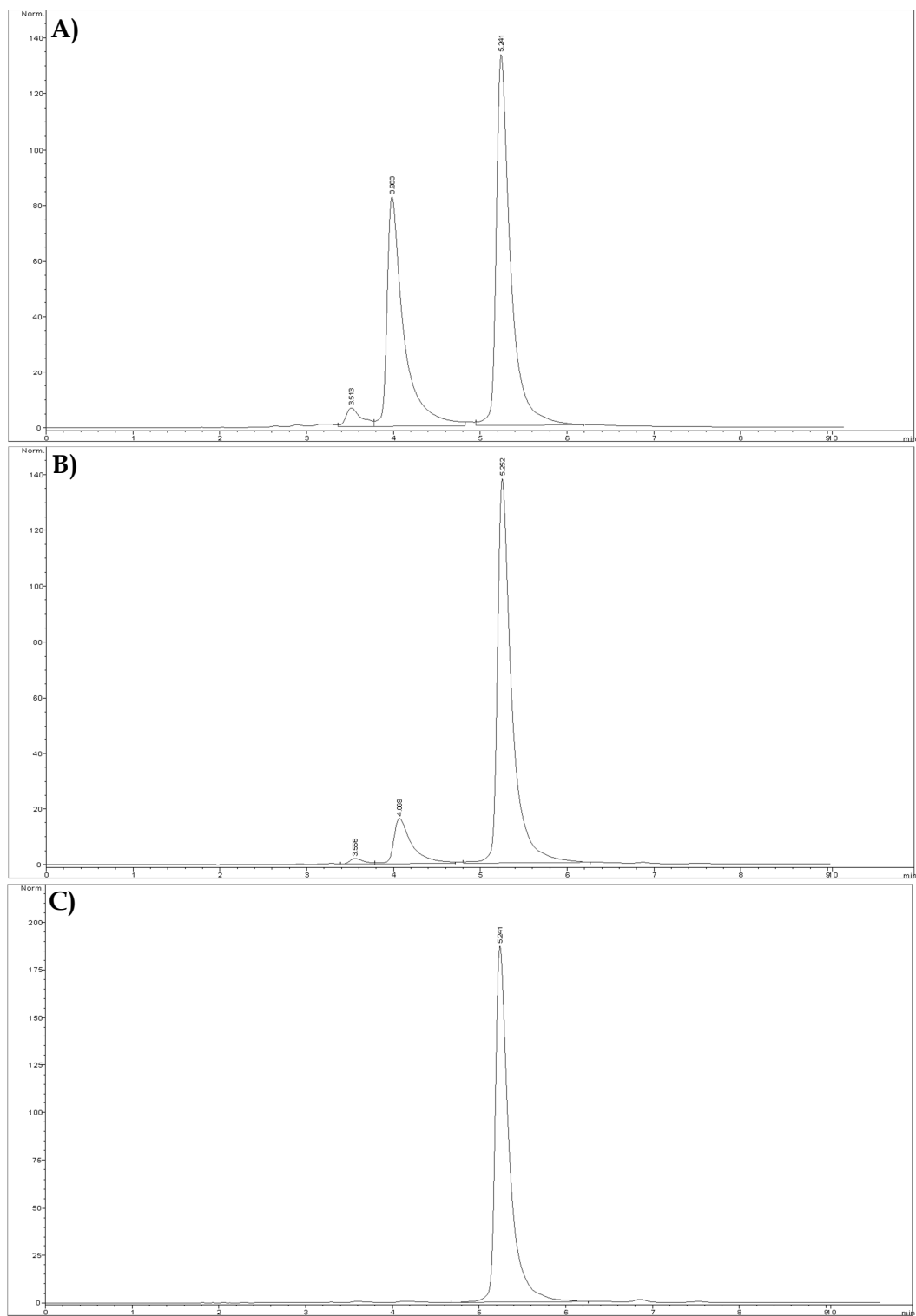
Anexo 6.7: Espectro Infrarrojo de *Cresyl Red* tribromado.



ANEXO 7
CROMATOGRAMAS



Anexo 7.1: Cromatogramas RP-HPLC. Síntesis *Neutral Red* monobromado. Relaciones *Neutral Red*: bromo. **A)** 1:0; **B)** 1:0,8; **C)** 1:0,85.



Anexo 7.2: Cromatogramas RP-HPLC. Síntesis *Neutral Red* monobromado. Relaciones *Neutral Red*: bromo. A) 1:0,9; B) 1:0,95; C) 1:1.



ANEXO 8
MEDIOS EMPLEADOS EN
INACTIVACIÓN FOTODINÁMICA

Anexo 8.1: Composición de Agar Müeller-Hinton y Caldo Müeller-Hinton.

Fórmula	Agar Müeller-Hinton	Caldo Müeller-Hinton
	g/L	g/L
Infusión de carne	300,00	300,00
Peptona ácida de caseína	17,50	17,50
Almidón	1,50	1,50
Agar	15,00	---

Anexo 8.2: Composición de Caldo Nutritivo.

Fórmula	g/L
Pluripeptona	5
Extracto de carne	3

Anexo 8.3: Composición del *Buffer* Fosfato Salino (10 mM; pH=7,4)

Compuesto	Concentración	
	mmol/L	g/L
NaCl	137,0	8,01
KCl	2,7	0,20
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	10,0	1,78
KH ₂ PO ₄	2,0	0,27



PUBLICACIONES CIENTÍFICAS



PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Las actividades realizadas durante el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral dieron origen a las siguientes publicaciones:

➤ **EN REVISTAS CIENTÍFICAS INTERNACIONALES**

- ✓ **Spectroscopic characterization and aggregation of azine compounds in different media.** *María Noel Urrutia, Cristina Ortiz. Chemical Physics. 2013; 412: 41-50.*
- ✓ **Analytical and preparative chromatographic procedures for obtaining pure Cresyl Violet and Cresyl Red from commercial Cresyl Violet.** *María Noel Urrutia, Cristina Ortiz. Invitación del Dr. Richard W. Horobin. Editor de Biotech Histochem. 2015; 90 (3):159-166.*
- ✓ **New azine compounds as photoantimicrobial agent.** *María Noel Urrutia, Fabiana Alovero, Cristina Ortiz. Dyes Pigments. 2015; 116:27-35.*

➤ **PREMIO OBTENIDO EN REUNIÓN CIENTÍFICA INTERNACIONAL**

- ✓ **Neutral Red monobrominated as photoantimicrobial agent against *Staphylococcus aureus*.** *María Noel Urrutia; Fabiana Alovero, Cristina Ortiz. 3^{ra} Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa). Córdoba, Argentina. 18 y 19 de Septiembre de 2014. Mención Especial en el Área de Química Medicinal.*

➤ **EN REUNIONES CIENTÍFICAS INTERNACIONALES**

- ✓ **Nuevos agentes Fotosensibilizadores para Terapia Fotodinámica: Síntesis y Caracterización.** *María Noel Urrutia*, María Noel Montes de Oca, Cristina S. Ortiz. XIII Congreso de la Federación Farmacéutica Sudamericana (FEFAS). San Juan, Argentina. 29-31 de Octubre de 2009.

- ✓ **Azine dyes: Spectroscopic and computational behavior. Singlet oxygen determination.** *María Noel Urrutia*, Diego M. Andrada, Adriana B. Pierini, Cristina S. Ortiz. Segunda Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. RICiFa. Rosario, Santa Fe, 22-23 de Noviembre de 2012.

- ✓ **Nuevo derivado fotosensibilizador: Síntesis y caracterización.** *María Noel Urrutia*, Cristina S. Ortiz. XXI Congreso de la Federación Panamericana de Farmacia (FEPAFAR), XVI Congreso de la Federación Farmacéutica Sudamericana (FEFAS) y XXI Congreso Farmacéutico Argentino (COFA). Salta, Argentina. 3-5 de Octubre de 2013.

- ✓ **Evaluación de las propiedades de nuevos agentes fotosensibilizadores.** *María Noel Urrutia*, Cristina S. Ortiz. XXI Congreso de la Federación Panamericana de Farmacia (FEPAFAR), XVI Congreso de la Federación Farmacéutica Sudamericana (FEFAS) y XXI Congreso Farmacéutico Argentino (COFA). Salta, Argentina. 3-5 de Octubre de 2013.

- ✓ **Neutral Red monobrominated as photoantimicrobial agent against *Staphylococcus aureus*.** *María Noel Urrutia*; Fabiana Alovero, Cristina Ortiz. 3^{ra} Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa). Córdoba, Argentina. 18 y 19 de Septiembre de 2014.

➤ **EN REUNIONES CIENTÍFICAS NACIONALES**

✓ **Caracterización y Halogenación de Neutral Red: Nuevas Drogas Fotosensibilizadoras.** *María Noel Urrutia*, María Noel Montes de Oca y Ortiz Cristina S. 3^{er} Workshop Argentino de Química Medicinal. Los Cocos, Córdoba. 10 y 11 de Noviembre de 2008.

✓ **Estudio de Nuevos Fotosensibilizadores con aplicación en Terapia Fotodinámica.** *María Noel Urrutia* y Cristina S. Ortiz. 4^{to}. Workshop Argentino de Química Medicinal. Universidad Nacional de Lanús. Lanús. Buenos Aires. 14 y 15 de Septiembre de 2010.

✓ **Síntesis y caracterización de un nuevo agente fotosensibilizador.** *María Noel Urrutia* y Cristina S. Ortiz. XVIII Simposio Argentino de Química Orgánica (SINAQO). Villa Carlos Paz, Córdoba. 13-16 de Noviembre de 2011.

✓ **Caracterización de nuevos compuestos fotosensibilizadores.** *María Noel Urrutia* y Cristina S. Ortiz. XVIII Simposio Argentino de Química Orgánica (SINAQO). Villa Carlos Paz, Córdoba. 13-16 de Noviembre de 2011.