



# **“DESARROLLO DE FOTOSENSIBILIZADORES DE SEGUNDA Y TERCERA GENERACIÓN APLICABLES A TERAPIA FOTODINÁMICA”**

**TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**JIMENA VARA**

**-2017-**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Farmacia

Unidad de Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología farmacéutica  
(UNITEFA-CONICET)

# 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. MARÍA ANGÉLICA PERILLO**

Departamento de Química  
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales  
Universidad Nacional de Córdoba

**Prof. Dra. FABIANA ALOVERO**

Departamento de Farmacia  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Nacional de Córdoba

**Prof. Dr. TOMÁS TEMPESTI**

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

## **EVALUADOR EXTERNO**

**Prof. Dra. MÓNICA CRISTINA GONZALEZ**

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

## ÍNDICE

---

<b>RESUMEN.....</b>	<b>7</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>11</b>
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>15</b>
<b>1. TERAPIA FOTODINÁMICA.....</b>	<b>17</b>
<b>2. PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA.....</b>	<b>20</b>
<b>3. FACTORES CLAVES EN TERAPIA FOTODINÁMICA.....</b>	<b>21</b>
3.1. AGENTE FOTOSENSIBILIZADOR.....	21
3.1.1. FOTOSENSIBILIZADORES DE PRIMERA GENERACIÓN.....	23
3.1.2. FOTOSENSIBILIZADORES DE SEGUNDA GENERACIÓN.....	24
3.1.2.1. Fotosensibilizadores porfirínicos.....	25
3.1.2.2. Fotosensibilizadores no porfirínicos.....	26
3.1.2.3. Fotosensibilizador endógeno: precursores.....	28
3.1.3. FOTOSENSIBILIZADORES DE TERCERA GENERACIÓN.....	29
3.1.3.1. Liposomas.....	30
3.1.3.2. Micelas.....	31
3.1.3.3. Nanopartículas sólidas.....	32
3.2. FUENTES DE LUZ.....	34
<b>4. TRATAMIENTO FOTODINÁMICO.....</b>	<b>37</b>

---

<b>5. APLICACIONES TERAPÉUTICA.....</b>	<b>38</b>
5.1. ONCOLÓGICAS.....	38
5.2. NO ONCOLÓGICAS.....	39
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>40</b>
<b>CAPÍTULO 2: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE FOTOSENSIBILIZADORES DE SEGUNDA</b>	
<b>GENERACIÓN.....</b>	<b>45</b>
<b>1. DISEÑO DE FOTOSENSIBILIZADORES DE SEGUNDA GENERACIÓN.....</b>	<b>47</b>
1.1. SELECCIÓN DE PROTOTIPOS.....	48
1.2. ESTRATEGIAS DE SÍNTESIS.....	50
<b>2. FORMACIÓN DE AZO-COMPUESTOS DE ROJO NEUTRO.....</b>	<b>51</b>
2.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
<b>3. YODACIÓN DE MAGENTA III Y AZURE B.....</b>	<b>55</b>
3.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
3.1.1. DERIVATIZACIÓN DE MAGENTA III.....	55
3.1.2. DERIVATIZACIÓN DE AZURE B.....	56
3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
3.2.1. YODACIÓN DE MAGENTA III.....	57
3.2.2. YODACIÓN DE AZURE B.....	60
<b>4. SELECCIÓN DEL FOTOSENSIBILIZADOR LIDER.....</b>	<b>63</b>
4.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	64
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>65</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>66</b>

**CAPÍTULO 3: PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y FOTOQUÍMICAS DE FOTOSENSIBILIZADORES**

DE SEGUNDA GENERACIÓN.....	71
<b>1. RELEVANCIA EN EL DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS.....</b>	<b>73</b>
<b>2. DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE IONIZACIÓN.....</b>	<b>73</b>
2.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	75
2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	76
<b>3. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD.....</b>	<b>77</b>
3.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	78
3.1.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	80
3.1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	80
3.2. ESTABILIDAD QUÍMICA.....	82
3.2.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	82
3.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	83
3.3. ESTABILIDAD FOTOQUÍMICA.....	84
3.3.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	84
3.3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	84
<b>4. ESTUDIO DE AGREGACIÓN.....</b>	<b>88</b>
4.1. EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL FOTOSENSIBILIZADOR.....	90
4.1.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	90
4.1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	91
4.1.2.1. Agregación de AzB y AzBBr en solventes orgánicos.....	91
4.1.2.2. Agregación de AzB y AzBBr en mezclas etanol: agua y agua pura.....	97
4.1.2.3. Agregación de TN y AM en DMF y agua pura.....	99
4.1.2.4. Tendencia a la agregación de AzB y AzBBr, TN y AM.....	101

4.2. EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA.....	102
4.2.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	102
4.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	102
4.3. DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE DIMERIZACIÓN.....	104
4.3.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	104
4.3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	105
<b>5. PRODUCCIÓN DE OXIGENO SINGLETE.....</b>	<b>106</b>
5.1. LUMINISCENCIA DEL OXÍGENO SINGLETE.....	
108	
5.1.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	108
5.1.2. RESULTADO Y DISCUSIÓN.....	109
5.2. FOTOOXIDACIÓN DE 9,10 DIMETILANTRACENO.....	110
5.2.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	110
5.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	111
5.3. EFECTO DESACTIVANTE DEL OXIGENO SINGLETE.....	112
5.3.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	113
5.3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	114
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>116</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>118</b>
<b>CAPÍTULO 4: PREPARACIÓN DE FOTOSENSIBILIZADORES DE TERCERA GENERACIÓN....</b>	<b>125</b>
<b>8. LIPOSOMAS EN LA VEHICULIZACIÓN DE FOTOSENSIBILIZADORES.....</b>	<b>127</b>
<b>9. PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS.....</b>	<b>131</b>
9.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	132
9.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	133

---

<b>10. SELECCIÓN DEL FOSFOLÍPIDO: ESTUDIO DE AGREGACIÓN DE LOS FOTOSENSIBILIZADORES EN LIPOSOMAS.....</b>	<b>133</b>
10.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	134
10.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	134
<b>11. ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LOS FOTOSENSIBILIZADORES EN LIPOSOMAS MULTILAMELARES.....</b>	<b>137</b>
11.1. SELECCIÓN DEL AGENTE TENSIOACTIVO.....	137
11.1.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	137
11.1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	138
11.2. ENSAYO DE ESTABILIDAD.....	141
11.2.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	141
11.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	141
<b>12. EFECTO DE DISPERSIÓN OCASIONADA POR LAS VESÍCULAS MULTILAMELARES.....</b>	<b>142</b>
12.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	143
12.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	143
<b>13. INTERACCIÓN FOTOSENSIBILIZADOR-VESÍCULAS MULTILAMELARES.....</b>	<b>144</b>
13.1. DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE PARTICIÓN EN MEMBRANA.....	144
13.1.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	145
13.1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	145
13.2. LOCALIZACIÓN DE LOS FOTOSENSIBILIZADORES EN LA MEMBRANA LIPÍDICA..	146
13.2.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	147
13.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	148
<b>14. DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA ENCAPSULACIÓN.....</b>	<b>150</b>

---

14.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	151
14.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	152
<b>15. CONCLUSIONES.....</b>	<b>153</b>
<b>16. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>154</b>

**CAPÍTULO 5: PROPIEDADES FOTOQUÍMICAS DE FOTOSENSIBILIZADORES DE TERCERA**

GENERACIÓN.....	159
-----------------	-----

<b>1. EFECTO DE LA VEHICULIZACIÓN EN LAS PROPIEDADES FOTOQUÍMICAS DE LOS FOTOSENSIBILIZADORES.....</b>	<b>161</b>
--	------------

<b>2. DETERMINACIÓN DE LOS RENDIMIENTOS CUÁNTICOS DE FORMACIÓN DE OXÍGENO SINGLETE.....</b>	<b>162</b>
---	------------

2.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	163
--------------------------------	-----

2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	165
----------------------------------	-----

<b>3. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD FOTOQUÍMICA.....</b>	<b>167</b>
---	------------

3.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	167
--------------------------------	-----

3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	168
----------------------------------	-----

<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>171</b>
-----------------------------	------------

<b>5. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>171</b>
-----------------------------	------------

<b>CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>175</b>
------------------------------------	------------

<b>PROYECCIONES.....</b>	<b>177</b>
--------------------------	------------

<b>PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....</b>	<b>181</b>
-----------------------------------	------------

## RESUMEN

---

Los Fotosensibilizadores (Fs) son compuestos químicos fotoactivables, que en su estado basal no presentan actividad citotóxica, pero que al ser excitados con luz de longitud de onda apropiada, desencadenan una serie de reacciones intracelulares para dar origen a especies altamente reactivas de oxígeno, que ocasionan la muerte celular. Estos compuestos se emplean en Terapia Fotodinámica (TFD) como una valiosa alternativa para el diagnóstico y tratamiento de diferentes tipos de cánceres. Se conoce como Terapia Fotodinámica Antimicrobiana (TFDA), cuando esta modalidad terapéutica se aplica al tratamiento de enfermedades ocasionadas por microorganismos, tales como hongos, virus y bacterias, incluso aquellos resistentes a los tratamientos convencionales. Ambas terapias, aunque todavía emergentes, son estrategias exitosas, clínicamente aprobadas y que presentan numerosas ventajas con respecto a los tratamientos convencionales. Estas alternativas terapéuticas se caracterizan por ser una intervención escasamente invasiva, presentar baja toxicidad en tejidos normales y mínimos efectos sistémicos, no generar mecanismos intrínsecos o adquiridos de resistencia, como así también preservar el funcionamiento de órganos y tejidos tratados. La TFD y TFDA son herramientas fundamentales y ampliamente evaluadas para afrontar dos problemáticas mundiales de la salud, a las cuales la Organización Mundial de la Salud hace referencia en sus publicaciones: el tratamiento del cáncer y la resistencia a antibióticos. Por estas razones, el desarrollo de nuevos Fs y diferentes alternativas que mejoren la eficacia de estas metodologías terapéuticas, constituyen un importante campo de investigación científica.

Esta Tesis Doctoral aborda diferentes estrategias de síntesis a fin de optimizar las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de los Fs no porfirínicos Rojo Neutro (RN), Magenta III (MG<sup>III</sup>) y Azure B (AzB). Los productos obtenidos mediante las reacciones de yodación y formación de azo-compuestos se analizaron aplicando diferentes técnicas cromatográficas y se caracterizaron por espectrometría de masas de alta resolución. La inestabilidad química de la sal de diazonio del compuesto RN y la formación de la especie carbinol del derivado yodado de MG<sup>III</sup>, motivaron la selección del derivado mono-yodado de AzB (AzBI) para continuar con el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Frente al desafío de seleccionar el Fs tiazínico líder y profundizar el estudio sobre sus propiedades de interés farmacéutico, se compararon las condiciones de síntesis, longitud de onda máxima absorción y rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete correspondiente a AzBI y el derivado mono-bromado de AzB (AzBBr), sintetizado previamente en el grupo de investigación. En base a los resultados obtenidos se seleccionó al compuesto AzBBr para dar continuidad a este trabajo Doctoral.

Se evaluaron diferentes propiedades de interés farmacéutico y se demostró que los Fs tiazínicos son compuestos catiónicos y químicamente estables en condiciones fisiológicas. La halogenación incrementó la degradación fotoquímica y desestabilizó la especie fotodinámicamente activa del agente fototerapéutico AzB.

Los estudios de agregación permitieron identificar a la especie monomérica de los Fs tiazínicos, que por décadas fueron asignadas erróneamente. Además, se establecieron las tendencias de dimerización y formación de agregados superiores de los compuestos AzB, AzBBr, Azul de metileno y Tionina, como representantes más estudiados de esta familia de Fs. Por otra parte, los estudios fotoquímicos revelaron que la especie dimérica de estos fármacos presenta mejores propiedades fotoquímicas que las otras especies en solución.

Con el objetivo de optimizar las propiedades de estos compuestos, se vehicularon en liposomas multilamelares de Fosfatidilcolina de huevo y Dipalmitoil-Fosfatidilcolina. La incorporación de los Fs en las vesículas lipídicas disminuyó el fenómeno de agregación de los agentes fotodinámicos, siendo el fosfolípido natural, el que mayor efecto produjo, por lo que se seleccionó para el desarrollo de Fs de tercera generación. También se evaluó la localización de AzB y AzBBr en los sistemas de vehiculización y se estableció la relación fosfolípido-Fs óptima para la encapsulación de estas estructuras tiazínicas.

Finalmente se abordaron diferentes propiedades fotofísicas y fotoquímicas de los Fs en la matriz liposomal. Estos sistemas disminuyeron la formación de agregados superiores de los derivados tiazínicos y consecuentemente incrementaron la producción de oxígeno singlete de los compuestos AzB y AzBBr, en comparación con los Fs libres. El empleo de este recurso tecnológico, incrementó la estabilidad fotoquímica del derivado monobromado, lo cual permitiría duplicar la dosis de luz apropiada en el tratamiento fotodinámico.

En conclusión, la vehiculización liposomal de los agentes fototerapéuticos tiazínicos en liposomas demostró ser una estrategia exitosa, que mejoró las propiedades de los Fs de segunda generación y potenció su posible aplicación en el tratamiento fotodinámico de numerosas patologías.

## OBJETIVOS

---

La Terapia Fotodinámica ha experimentado un crecimiento vertiginoso en las últimas décadas, por ser una herramienta prometedora para el abordaje de importantes problemáticas de salud, tales como el tratamiento de afecciones oncológicas y la resistencia de microorganismos a los agentes antimicrobianos, entre otras.

Los avances científicos y tecnológicos han potenciado las aplicaciones de esta modalidad terapéutica. Sin embargo, se dispone de un número escaso de Fotosensibilizadores aprobados para su uso clínico, los cuales distan de reunir las características óptimas para su aplicación terapéutica. Como consecuencia de ello, se requiere la administración de elevadas concentraciones del fármaco para alcanzar buena eficiencia, limitándose generalmente al tratamiento de patologías superficiales. Tal situación puso de manifiesto la necesidad del desarrollo de nuevos agentes terapéuticos y motivó el desarrollo de esta Tesis Doctoral, planteando los siguientes objetivos:

### OBJETIVO GENERAL

Con la finalidad de contribuir al desarrollo de la Fotomedicina, ciencia referida a la interacción de fármacos y luz, el objetivo de esta Tesis Doctoral es desarrollar nuevos agentes terapéuticos para su potencial aplicación en Terapia Fotodinámica. Siendo el principal desafío, obtener Fotosensibilizadores que presenten alta efectividad citotóxica con máxima selectividad sobre las células anormales. Esto proporcionaría una disminución de los efectos adversos asociados a los tratamientos actuales, contribuyendo así a la eficacia, seguridad y confiabilidad de esta novedosa alternativa terapéutica.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

➤ ***Sintetizar, caracterizar y determinar las propiedades de interés farmacéutico de los Fotosensibilizadores de Segunda Generación.***

A fin de obtener compuestos con mejores propiedades farmacéuticas que los

comerciales, se propusieron derivatizaciones que permitan optimizar algunos de los requerimientos de un Fotosensibilizador ideal. Cabe destacar que estos fármacos deben ser fáciles de sintetizar, estables, citotóxicos en presencia de luz, selectivos, con absorción en la región roja del espectro electromagnético presentando alto coeficiente de extinción molar, poseer mínima tendencia a la agregación y rápida eliminación del organismo.

En este marco, se propone la yodación y la formación de azo-compuestos de Fotosensibilizadores tiazínicos, azínicos y triarilmetanos. Asimismo, determinar las propiedades fisicoquímicas, fotofísicas y fotoquímicas es una etapa relevante en el desarrollo de nuevos Fotosensibilizadores, entre las cuales se destacan la constante de ionización, agregación en diferentes medios, estabilidad química y fotoquímica, como así también el mecanismo de acción fotodinámico.

➤ ***Preparar, caracterizar y determinar las propiedades fisicoquímicas, fotofísicas y fotoquímicas de Fotosensibilizadores de Tercera Generación.***

El uso clínico de numerosos Fotosensibilizadores de primera y segunda generación se ha visto dificultado por el daño inespecífico, degradación biológica e hidrofobicidad, entre otras propiedades que presentan estos fármacos. A fin de superar estos inconvenientes, diferentes estrategias de encapsulación han sido estudiadas para obtener sistemas de liberación biodegradables, con una mínima inmunogenicidad y capacidad de incorporar al agente fototerapéutico sin alterar su actividad, proporcionando un medio adecuado para la administración. Estas formulaciones, denominadas de tercera generación, permiten mejorar la eficacia y seguridad de los Fotosensibilizadores.

Por lo expuesto se propone como segundo objetivo específico desarrollar vesículas multilamelares y evaluar el efecto de la vectorización en las propiedades fisicoquímicas, fotofísicas y fotoquímicas más relevantes de los compuestos seleccionados.

## ABREVIATURAS

---

<b>ABDA</b>	Ácido dimalónico de 9,10-dimetilantraceno, <i>siglas en inglés</i>
<b>AcOH</b>	Ácido acético
<b>ALA</b>	Ácido 5-aminolevulínico
<b>AM</b>	Azul de Metileno
<b>ANMAT</b>	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología
<b>AT</b>	Azul de Toluidina
<b>AzA</b>	Azure A
<b>AzB</b>	Azure B
<b>AzBBr</b>	Azure B mono-bromado
<b>AzBI</b>	Azure B mono-yodado
<b>AzC</b>	Azure C
<b>CTAB</b>	Bromuro de cetiltrimetilamonio, <i>siglas en inglés</i>
<b>CV</b>	Cristal Violeta
<b>DLS</b>	Dispersión dinámica de la luz, <i>siglas en inglés</i>
<b>DMA</b>	9,10-dimetilantraceno
<b>DMF</b>	N,N-dimetilformamida
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DPH</b>	Difenilhexatrieno, <i>siglas en inglés</i>
<b>dpPC</b>	Dipalmitoil-Fosfatidilcolina, <i>siglas en inglés</i>
<b>DT</b>	Detergente
<b>EE</b>	Eficacia de encapsulación
<b>EPC</b>	Fosfatidilcolina de huevo, <i>siglas en inglés</i>
<b>ERO</b>	Especies reactivas del oxígeno
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FRET</b>	Transferencia de energía de resonancia de Förster, <i>siglas en inglés</i>
<b>Fs</b>	Fotosensibilizador
<b><sup>1</sup>Fs</b>	Fotosensibilizador en estado singlete basal o fundamental
<b><sup>1</sup>Fs*</b>	Fotosensibilizador en estado singlete excitado
<b><sup>3</sup>Fs*</b>	Fotosensibilizador en estado triplete excitado

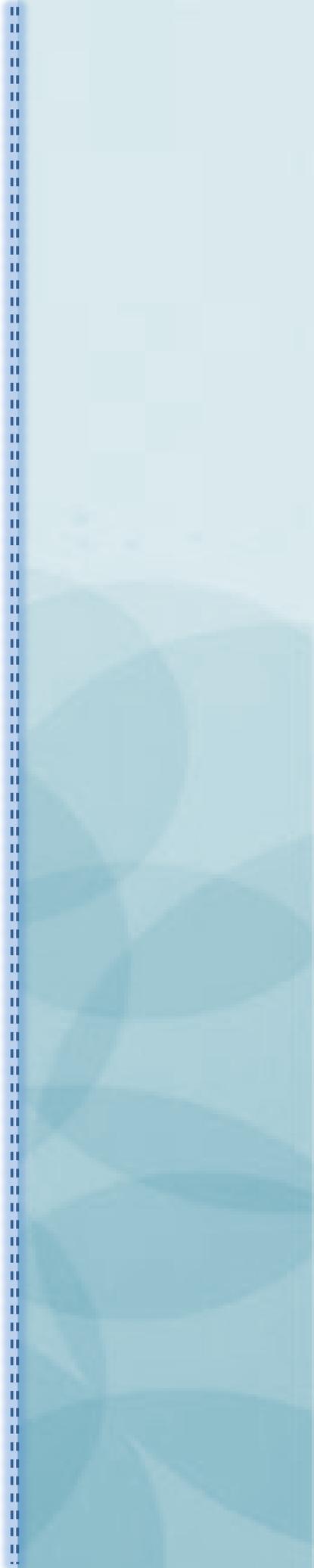
<b>HAL</b>	Hexil éster del ácido 5-aminolevulínico
<b>Hp</b>	Hematoporfirina
<b>HpD</b>	Derivados de Hematoporfirina, <i>siglas en inglés</i>
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia, <i>siglas en inglés</i>
<b>IF</b>	Intensidad de fluorescencia
<b>IP</b>	Índice de polidispersidad
<b>K<sub>d</sub></b>	Constante de dimerización
<b>k<sub>obs</sub></b>	Constante de velocidad observada
<b>k<sub>p</sub></b>	Coefficiente de partición membrana-agua
<b>LC</b>	Límite de cuantificación
<b>LD</b>	Límite de detección
<b>LED</b>	Diodos emisores de luz, <i>siglas en inglés</i>
<b>m/z</b>	Relación masa/carga, <i>siglas en inglés</i>
<b>MAL</b>	Metil éster del ácido 5-aminolevulínico
<b>MeOD</b>	Metanol deuterado
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MG<sup>III</sup></b>	Magenta III
<b>MG<sup>III</sup>I<sub>2</sub></b>	Magenta III di-yodado
<b>MG<sup>III</sup>I<sub>3</sub></b>	Magenta III tri-yodado
<b>MLV</b>	Vesículas multilamelares
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno singlete
<b>pK<sub>a</sub></b>	Constante de ionización o de disociación ácida
<b>PpIX</b>	Protoporfirina IX
<b>PR</b>	Porcentaje de recuperación
<b>PRG</b>	Porcentaje de recuperación global
<b>r</b>	Coefficiente de regresión lineal
<b>RB</b>	Rosa de Bengala
<b>R<sub>f</sub></b>	Relación de frentes
<b>RN</b>	Rojo Neutro
<b>RSD</b>	Desviación estándar relativa, <i>siglas en inglés</i>
<b>SD</b>	Desviación estándar, <i>siglas en inglés</i>
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sodio, <i>siglas en inglés</i>
<b>SRE</b>	Sistema retículo-endotelial
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura de transición de la fase gel a la líquido-cristalina

---

<b><math>t_{90}</math></b>	Tiempo de vida útil
<b>TFD</b>	Terapia Fotodinámica
<b>TFDA</b>	Terapia Fotodinámica Antimicrobiana
<b>TEAP</b>	Solución acuosa de fosfato de trietilamina, <i>siglas en inglés</i>
<b>TLC</b>	Cromatografía en capa delgada, <i>siglas en inglés</i>
<b>TMA-DPH</b>	Trimetilamonio Difenilhexatrieno, <i>siglas en inglés</i>
<b>TN</b>	Tionina
<b><math>t_{obs}</math></b>	<i>t-Student</i> observada o calculada
<b><math>t_R</math></b>	Tiempo de retención
<b><math>t_r</math></b>	<i>t-Student</i> obtenida para el coeficiente de regresión lineal
<b><math>V_M</math></b>	Volumen de membrana
<b><math>V_w</math></b>	Volumen de fase acuosa
<b><math>\varepsilon</math></b>	Coefficiente de absortividad molar
<b><math>\lambda_{em}</math></b>	Longitud de onda de máxima emisión
<b><math>\lambda_{ex}</math></b>	Longitud de onda de excitación
<b><math>\lambda_{max}</math></b>	Longitud de onda de máxima absorción
<b><math>\Phi_{\Delta}</math></b>	Rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete

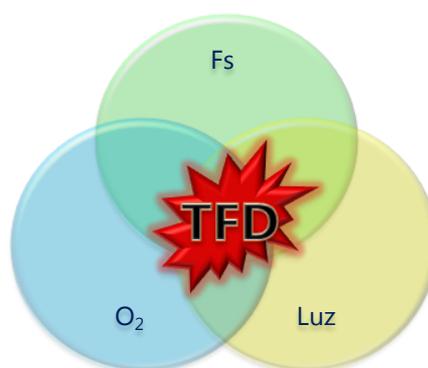
# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**



## 1. TERAPIA FOTODINÁMICA

La terapia fotodinámica (TFD), también conocida como terapia por fotorradiación, fototerapia o fotoquimioterapia, es un tratamiento que involucra la administración de medicamentos especiales, denominados agentes fotosensibilizantes o fotosensibilizadores (Fs). Esta alternativa terapéutica se desarrolla en presencia de luz y oxígeno molecular, para desencadenar la muerte de células específicas (**Figura 1**).<sup>1</sup> La misma es una técnica simple y eficaz que ha experimentado un crecimiento vertiginoso, permitiendo el tratamiento de numerosas patologías brindando resultados alentadores.<sup>2,3</sup> Una de las principales ventajas que presenta la TFD frente a los tratamientos convencionales, es la alta selectividad. Cada uno de los componentes necesarios para desencadenar la inactivación celular (Fs, luz y oxígeno) son inocuos por sí mismos, se requiere de una combinación de estos tres elementos para ocasionar el efecto terapéutico. Aun cuando el fármaco se incorpore a células sanas, sólo las áreas irradiadas serán afectadas por la actividad terapéutica. Por tal motivo, la selectividad de la fotoquimioterapia se puede mejorar incrementando la concentración del Fs en el tejido blanco y limitando la irradiación a un área específica.<sup>4</sup>



**Figura 1:** Elementos esenciales para el tratamiento fotodinámico.

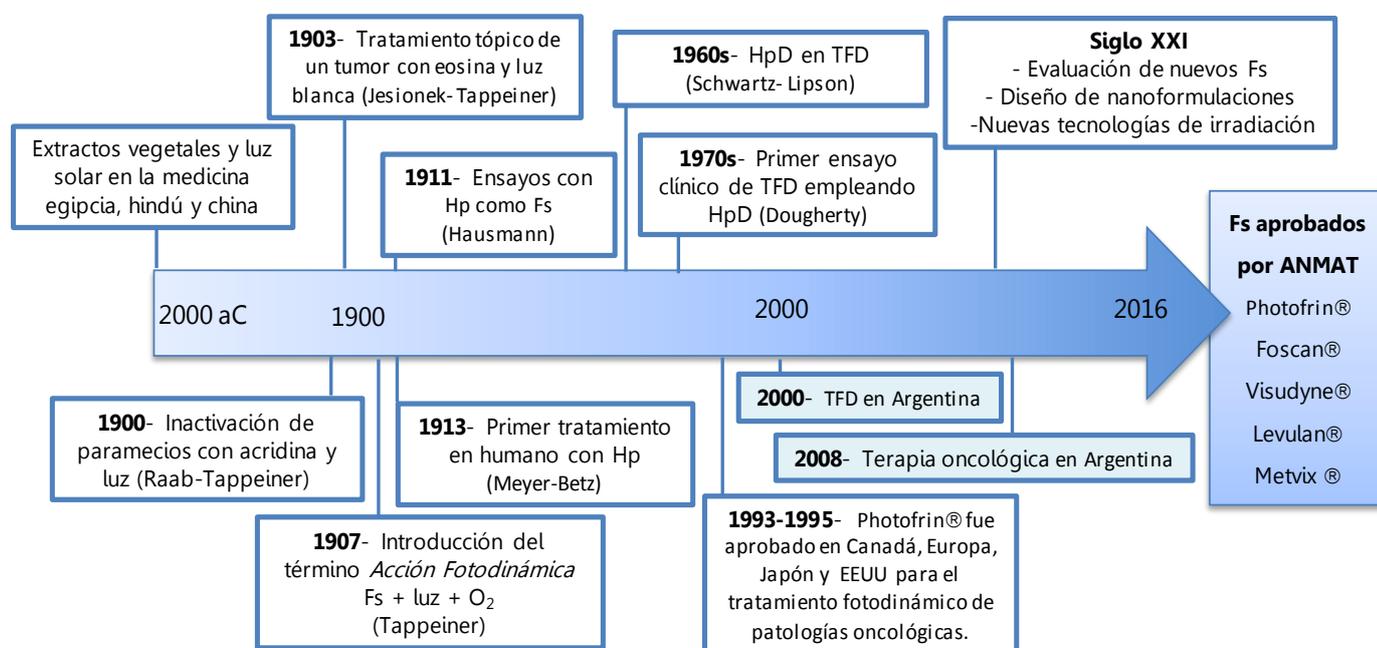
Antiguamente se pensó que la luz solar era el único responsable de la reversión de trastornos tales como vitiligo, psoriasis, raquitismo, cáncer de piel e incluso psicosis. La utilización de luz combinada con sustancias fotosensibles es, en realidad, un enfoque antiguo para el tratamiento de diferentes patologías. Este proceso terapéutico basado en la exposición al sol se denominó fototerapia o helioterapia. Sin embargo, con el avance de la ciencia, se observó que existen sustancias endógenas involucradas en la reversión de estas patologías y que el proceso fotodinámico es el mecanismo más preciso para

explicar los efectos curativos de la luz. Se dispone de documentos de 1200-2000 a.C. que representan médicos egipcios y chinos, así como profesionales hindúes, utilizando combinaciones de extractos vegetales con la exposición a la luz solar para el tratamiento de trastornos de la piel.<sup>5</sup> Sin embargo, las bases de la TFD fueron investigadas y reportadas por Tappeiner y sus colaboradores durante los primeros años del siglo XX. Junto al estudiante de medicina Raab evaluaron, en el año 1900, el efecto de acridina sobre *Paramecium caudatum*, y demostraron que la inactivación de los protozoos tratados sólo se producía luego de la exposición a la luz. Como consecuencia de este descubrimiento, en el año 1903, bajo la colaboración del dermatólogo Jesionek, reportaron el tratamiento de un tumor de piel mediante la aplicación tópica de eosina e irradiación con luz blanca. En estudios posteriores, Tappeiner demostró que la toxicidad celular requería de la combinación fotosensibilizador-luz-oxígeno y en el año 1907 introdujeron el término "acción fotodinámica" para describir este fenómeno.<sup>6-8</sup>

Con el objetivo de optimizar y estandarizar la TFD, numerosos Fs fueron evaluados. Los primeros experimentos que emplearon hematoporfirina (Hp) como agente fotosensibilizante, fueron realizados por Hausmann en el año 1911, y desde entonces, las porfirinas se destacan como las sustancias más eficaces y estudiadas en la TFD para el diagnóstico y tratamiento de diversos tejidos neoplásicos. Freiderich Meyer-Betz realizó la primera prueba humana relativa a la aplicación de TFD mediada por la autoaplicación de Hp y luz solar. Durante los posteriores 60 años, el efecto fotodinámico fue estudiado de forma intermitente. Desde la década del 60, los derivados de la hematoporfirina (HpD, siglas en inglés), presentados por Lipson como una mezcla compleja de diez ésteres de porfirinas, se mantuvieron como los fotosensibilizadores más importantes, siendo el porfímero de sodio (Photofrin<sup>®</sup>), el primer Fs aprobado para su aplicación clínica. En la década siguiente, Dougherty y colaboradores desarrollaron el primer ensayo clínico sistemático empleando la TFD para el tratamiento de cáncer en pacientes. En el año 1993, Canadá fue el país pionero en emplear este fármaco para el tratamiento del cáncer de vejiga. Posteriormente, se aprobó en Europa y Japón para la TFD de cáncer de pulmón, esófago, gástrico y cervical. En el año 1995, la FDA (*Food and Drug Administration*) autorizó la aplicación de Photofrin<sup>®</sup> en el tratamiento del cáncer esofágico avanzado y de estadios tempranos del cáncer de pulmón.<sup>5,7,9</sup>

En Argentina, la primera experiencia en TFD, fue desarrollada en el año 2000 por el Centro de Microscopia Electrónica de la Universidad Nacional de Córdoba. El estudio clínico, consistió en el tratamiento de 27 pacientes con queratosis actínica, utilizando ácido 5-aminolevulínico (ALA) como Fs e irradiación con una fuente de luz no coherente.

Todos los pacientes tratados, evidenciaron respuesta terapéutica y el 84% de los casos presentaron remisión completa de la enfermedad.<sup>10</sup> En el año 2008, la Argentina se convirtió en el primer país de latino América en aplicar esta terapia para el tratamiento del cáncer. El procedimiento se llevó a cabo en el Hospital General San Martín (La Plata, Buenos Aires) empleando Photofrin® como agente terapéutico. La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) lo aprobó para el tratamiento de cáncer de esófago, esófago de Barrett y cáncer de pulmón, siendo el Laboratorio Techsphere el responsable de la fabricación y comercialización de este medicamento en nuestro país.<sup>11</sup> Actualmente, existen 5 Fs autorizados por ANMAT para diferentes tratamientos fotodinámicos.<sup>11-15</sup> La **Figura 2** esquematiza la evolución de la TFD.

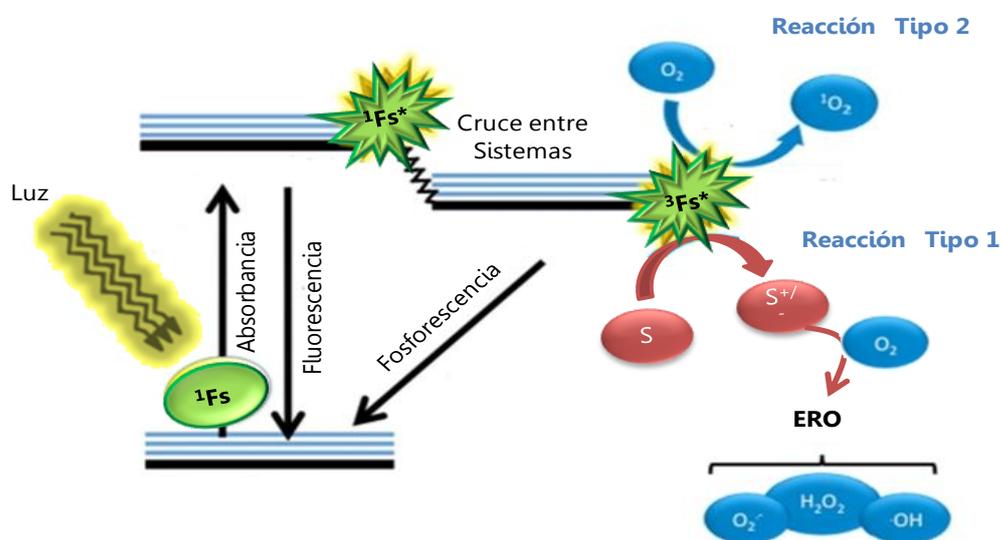


**Figura 2:** Resumen histórico de la TFD

Es importante destacar que en las últimas dos décadas, numerosas investigaciones están siendo desarrolladas con el objetivo de diseñar nuevos Fs o vehicularlos en diferentes nanotransportadores para mejorar sus propiedades terapéuticas, como así también se está estudiando la optimización de los sistemas de irradiación. Estas estrategias permitirán incrementar la seguridad, confiabilidad y eficacia de los tratamientos fotodinámicos.

## 2. PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA

Los procesos fotofísicos y fotoquímicos implicados en la TFD se ilustran en la **Figura 3**, y son los responsables de la muerte celular ocasionada por este tratamiento. Los dos aspectos más importantes de la TFD son los procesos de absorción de la luz y de transferencia de energía. Un Fs en estado basal o fundamental dispone de dos electrones con espines opuestos en un orbital molecular de baja energía; esto se conoce como el estado singlete ( $^1\text{Fs}$ ). Después de la absorción de luz en forma de fotones, uno de estos electrones es impulsado a un orbital de mayor energía, pero mantiene su sentido de giro, lo que da origen al primer estado singlete excitado del Fs ( $^1\text{Fs}^*$ ). Este estado es de corta duración y pierde su energía emitiendo luz por fluorescencia o por conversión en calor interno. Además, el Fs en estado excitado puede someterse a un proceso conocido como cruce entre sistemas, mediante el cual el espín del electrón excitado se invierte para pasar a un estado triplete excitado ( $^3\text{Fs}^*$ ), el cual presenta un tiempo de vida media mayor, lo que posibilita su interacción con moléculas del entorno e incrementa el potencial del Fs como agente terapéutico. El  $^3\text{Fs}^*$  puede perder energía mediante la emisión de luz, fenómeno denominado fosforescencia, o bien puede someterse a diferentes procesos fotoquímicos.<sup>16-18</sup>



**Figura 3:** Procesos fotofísicos y fotoquímicos implicados en la TFD.

Mediante el mecanismo Tipo I, el  $^3\text{Fs}^*$  puede interactuar directamente con un sustrato biológico (S), tal como la membrana celular, y transferirle un protón o electrón dando

origen a radicales aniónicos o catiónicos, respectivamente. Estos radicales pueden reaccionar adicionalmente con oxígeno para producir especies reactivas del oxígeno (ERO) tales como radical anión superóxido, radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno, principalmente. Alternativamente, por el mecanismo Tipo II, el  $^3\text{Fs}^*$  puede transferir su energía directamente al oxígeno molecular, para formar oxígeno singlete excitado ( $^1\text{O}_2$ ). Ambos mecanismos de acción fotodinámicos (Tipo I y II) pueden desencadenarse simultáneamente, y la relación entre estos procesos depende de las características intrínsecas del Fs utilizado, así como de las concentraciones de sustrato y oxígeno.<sup>16</sup> Debido a la alta reactividad y la corta vida media del  $^1\text{O}_2$  y de los diferentes radicales, sólo las moléculas y estructuras que se encuentran en proximidad a la zona de su producción, es decir en la región donde se localiza el Fs, están directamente afectados por la TFD.<sup>17</sup>

Algunos autores sugieren que paralelamente a los mecanismos Tipo I y Tipo II, podría producirse una interacción directa entre el sensibilizador excitado y biomoléculas presentes en el sistema que desencadenan la muerte celular. Este mecanismo involucra una acción tóxica del  $^3\text{Fs}^*$  sobre las células diana y es una vía independiente del oxígeno. Diferentes resultados experimentales y enfoques cinéticos adicionales han demostrado que este mecanismo difiere básicamente del Tipo I y, por lo tanto, se denomina mecanismo Tipo III.<sup>18,19</sup> Aunque estas tres vías podrían ocurrir durante el proceso de fotosensibilización, se sugiere que el Tipo II predomine sobre los demás. El  $^1\text{O}_2$ , generado por este mecanismo, presenta mayor reactividad que las otras ERO y provoca la destrucción irreversible de las células tratadas.<sup>19</sup>

### 3. FACTORES CLAVES EN TERAPIA FOTODINÁMICA

#### 3.1. AGENTE FOTSENSIBILIZADOR

Los Fs son compuestos químicos fotoactivables, que en su estado basal no presentan actividad citotóxica, pero que al ser excitados con luz de longitud de onda apropiada, desencadenan una serie de reacciones intracelulares para dar origen a ERO que ocasionan la muerte de células anormales.<sup>20</sup> Los Fs, junto al oxígeno y la irradiación, son los elementos claves del tratamiento fotodinámico. Por este motivo, el desarrollo de nuevos Fs desempeña un papel fundamental en la evolución de la TFD y por lo tanto, se ha convertido en un importante campo de investigación para las ciencias químicas y farmacéuticas.<sup>21</sup> Un gran número de agentes fotosensibilizantes han sido probados *in vivo* e *in vitro*, pero muy pocos han demostrado una adecuada eficacia y seguridad. La

búsqueda de nuevos y mejores fármacos fotodinámicos, implica considerar las siguientes características aceptadas como criterios que debe reunir un Fs ideal.<sup>17,18,22-27</sup>

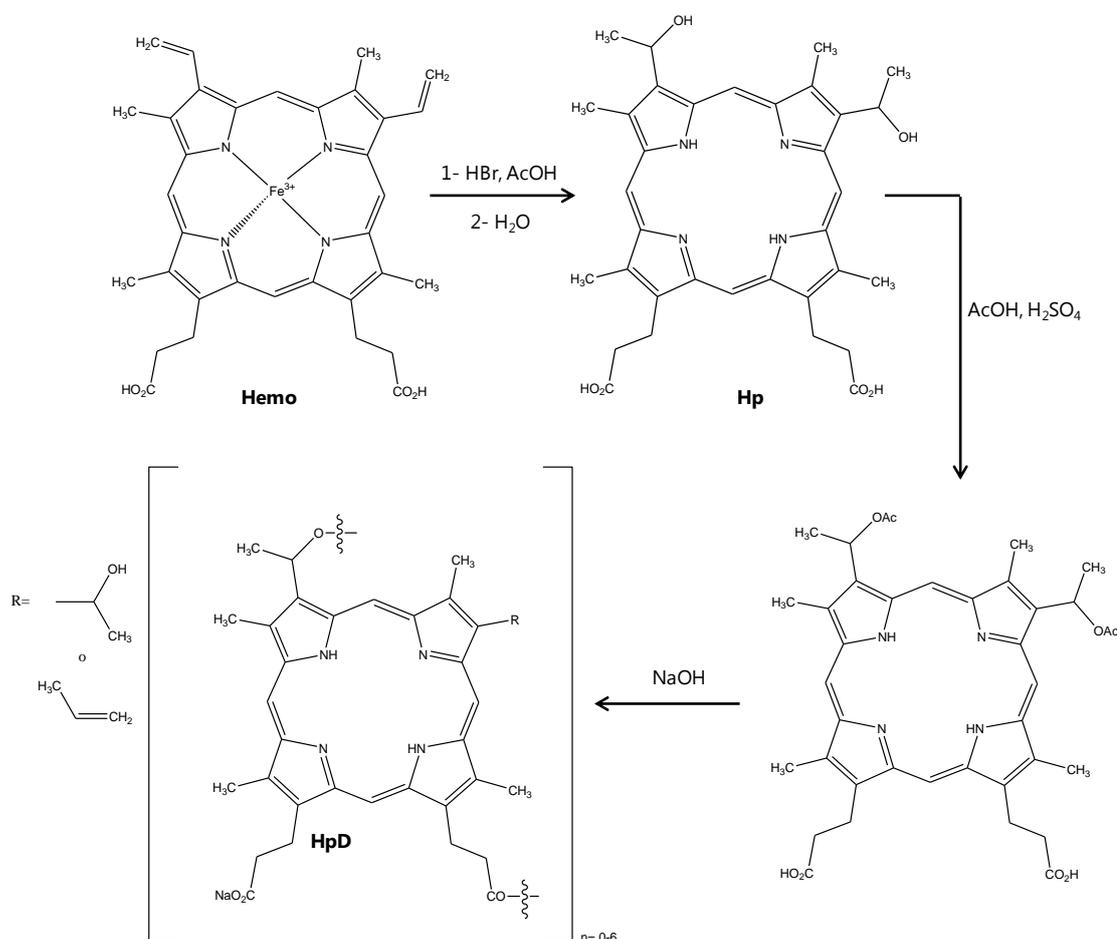
- Ser fácilmente sintetizado, a partir de precursores disponibles y mediante procedimientos reproducibles. Esto garantiza que los medicamentos estén disponibles comercialmente a bajo costo, con el fin de promover la aplicación del tratamiento.
- Presentar alto grado de pureza, composición química conocida y elevada estabilidad, tanto química como fotoquímica, en las condiciones fisiológicas y de almacenamiento.
- Caracterizarse por altos coeficientes de absorción molar entre 600 – 800 nm, intervalo denominado ventana fototerapéutica. En esta región del espectro electromagnético, la luz tiene buena capacidad de penetración en los tejidos, con baja dispersión, y energía suficiente para excitar el O<sub>2</sub> y generar un rendimiento sustancial de ERO.
- Presentar una excelente reactividad fotoquímica, con altos rendimientos de formación del estado triplete con tiempos de vida prolongados, siendo capaz de producir eficazmente <sup>1</sup>O<sub>2</sub> y otras ERO.
- Caracterizarse por una adecuada lipofilia. Ser solubles en los fluidos biológicos, presentando mínima tendencia a la agregación, y lipofílicos para llegar al sitio de acción e interactuar con las células dianas. Además, deben ser lo suficientemente hidrofílicos para incorporarse en formulaciones farmacéuticas de aplicación endovenosa o tópica.
- Presentar mínima toxicidad en oscuridad, siendo altamente citotóxico en presencia de luz a una longitud de onda definida. Los Fs no deben generar metabolitos tóxicos.
- Presentar retención preferencial en las células a tratar, siendo eliminados rápidamente del organismo, induciendo así una baja toxicidad sistémica.

Algunas de estas propiedades pueden ser fácilmente modificadas mediante el diseño de nuevos Fs (tales como la longitud de onda de máxima absorción). Sin embargo, otros aspectos involucrados en la manipulación del perfil farmacocinético, no son tan sencillos de controlar. Por lo tanto, la búsqueda de un nuevo agente terapéutico con la capacidad de satisfacer las necesidades químicas, físicas y biológicas de un Fs ideal está en curso y

ha dado origen a tres generaciones de agentes fototerapéuticos que serán descritas a continuación.<sup>28</sup>

### 3.1.1. FOTOSENSIBILIZADORES DE PRIMERA GENERACIÓN

Los HpD y Photofrin® son los representantes de los Fs de primera generación. Estos compuestos son derivados hematoporfíricos que han sido desarrollados durante la década del 70 y a principio de los 80.<sup>28</sup> La Hp fue obtenida por Scherer en el año 1841, mediante la eliminación del hierro del grupo Hemo de la sangre, luego del tratamiento con agua. Los HpD son una mezcla compleja de monómeros, dímeros y oligómeros, vinculados entre sí por la formación de éteres, ésteres y enlaces carbono-carbono, que se obtuvieron a partir del tratamiento de Hp con ácido acético (AcOH) y ácido sulfúrico. Los procesos asociados con su síntesis se ilustran en la **Figura 4**. La eliminación de los monómeros inactivos de los HpD, mediante el calentamiento de la mezcla de reacción en la última etapa de la síntesis hasta alcanzar la hidrólisis completa de los mismos, dio origen a Photofrin®, un producto que consiste en dímeros y trímeros de Hp unidos por la formación de éteres.<sup>24</sup>



**Figura 4:** Síntesis de los HpD

Los Fs de primera generación son una mezcla compleja de compuestos que si bien manifiestan buena eficacia como agentes fotodinámicos y se localizan preferentemente en las células tumorales, también exhiben una fotosensibilidad cutánea prolongada y baja intensidad de absorción en la ventana fototerapéutica.<sup>25,27</sup> Los pacientes tratados con estos Fs deben protegerse de la exposición a la luz solar y artificial durante un plazo de seis a diez semanas, a fin de disminuir los efectos adversos.<sup>24</sup>

Photofrin® fue el primer Fs aprobado para su aplicación clínica en el tratamiento de cáncer de vejiga (1993), esófago (1995), pulmón (1998) y síndrome de Barrett (2003). Actualmente se extiende a la terapia de diferentes patologías oncológicas de cabeza, cuello, abdomen, tórax, cerebro, intestino, cervical, piel y mama.<sup>24</sup>

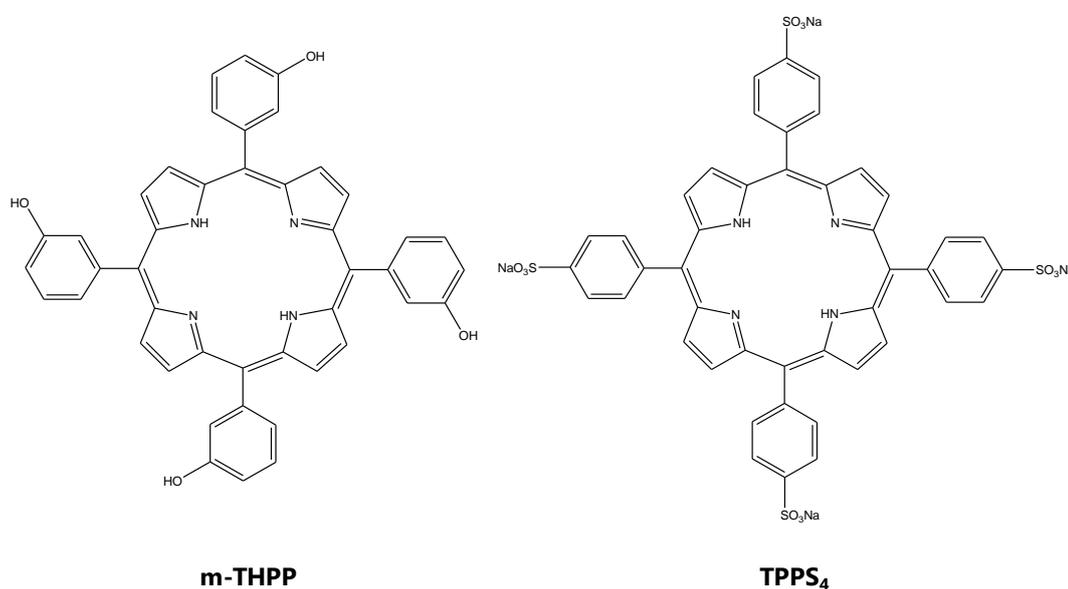
### 3.1.2. FOTOSENSIBILIZADORES DE SEGUNDA GENERACIÓN

Una segunda generación de compuestos ha sido específicamente diseñada para minimizar los efectos secundarios y las propiedades indeseables de sus predecesores. Estos fotosensibilizadores han facilitado la aplicación de la TFD en el tratamiento del cáncer y en numerosas enfermedades no oncológicas.<sup>27</sup> Generalmente, estos Fs son compuestos puros, de estructura química conocidas y que presentan máximos de absorción a longitudes de onda superiores a 630 nm con altos coeficientes de extinción molar y rendimientos cuánticos de formación de  $^1\text{O}_2$ , como así también selectividad por las células anormales en comparación con los HpD. Además, evidencian mejoras en las propiedades farmacocinéticas, acelerando la eliminación de los tejidos normales y reduciendo el tiempo del tratamiento fotodinámico, convirtiéndolo en un procedimiento ambulatorio y disminuyendo la fotosensibilidad cutánea (<2 semanas). Si bien estos compuestos han superado numerosas desventajas de los Fs de primera generación, la mayoría de ellos se caracterizan por ser altamente lipofílicos lo cual dificulta su biodisponibilidad, favorece la autoagregación e implica un desafío para la elaboración de una forma farmacéutica de administración endovenosa.<sup>25,29</sup>

La mayoría de los Fs de segunda generación se desarrollaron desde finales de la década del 80 y comprenden dos grandes grupos, derivados porfirínicos y no porfirínicos, además de una serie de precursores que inducen la formación de Fs endógenos. Los primeros comprenden estructuras macrocíclicas y sus derivados denominadas porfirinas, tales como clorinas, bacterioclorinas, ftalocianinas, porfíricenos y texafirinas, entre otros. Por otra parte los Fs no porfirínicos tales como las antraquinonas, fenotiazinas, xantenos y cianinas han presentado alentadores resultados en diferentes tratamientos fotodinámicos.<sup>24,25,28,30</sup>

### 3.1.2.1. Fotosensibilizadores porfirínicos

Entre los derivados de las porfirinas se destacan meta-tetra (hidroxifenil) porfirina (m-THPP, Foscan o Temoporfina) y 5,10,15,20- tetrakis (4 -sulfonatofenil) -21H, 23H-porfirina (TPPS<sub>4</sub>). Estos compuestos son estructuras puras, extremadamente potentes, que se fotoactivan a longitudes de ondas superiores a las correspondientes a HpD, con mayores coeficientes de extinción molar. Debido a la potencia de los Fs de segunda generación, las dosis de fármaco y la intensidad luminosa requeridas para obtener una respuesta similar a Photofrin® son hasta 100 veces más bajas, como consecuencia de las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de los nuevos Fs. Las estructuras químicas de estos compuestos se muestran en la **Figura 5**.

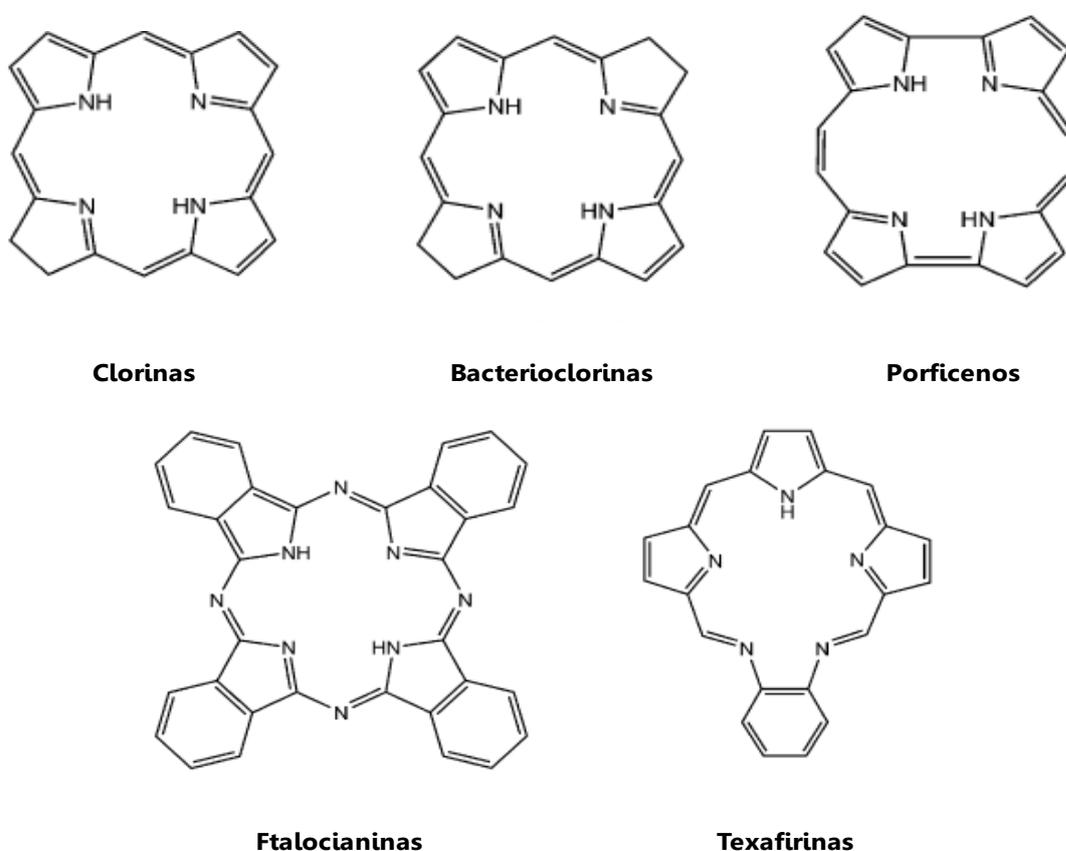


**Figura 5:** Derivados porfirínicos de segunda generación.

Las clorinas y bacterioclorinas (**Figura 6**) son porfirinas hidrofílicas reducidas, que exhiben dos propiedades importantes: alto rendimiento cuántico de producción de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> y banda de absorción intensa a longitudes de onda mayores, en comparación con las porfirinas, donde los tejidos biológicos son más transparentes a la luz. Particularmente las bacterioclorinas son candidatos atractivos para el tratamiento fotodinámico de diversas patologías, debido a su fuerte absorción en la región del infrarrojo cercano, pero presentan la desventaja de su potencial oxidación. Otras moléculas macrocíclicas similares a la porfirina son las ftalocianinas (**Figura 6**). Debido a su naturaleza aromática, estos compuestos absorben intensamente en la región del infrarrojo cercano, presentan muy buena producción de ERO y excepcional estabilidad. Una desventaja significativa de

las ftalocianinas es su baja solubilidad en diversos disolventes, por lo que evidencian elevada tendencia de agregación.<sup>24,30,31</sup>

Otros macrociclos porfirínicos menos estudiados, pero que presentan potenciales aplicaciones fotodinámicas y se destacan en diferentes fases de ensayos clínicos son los compuestos derivados de los porfíricos y las texafirinas (**Figura 6**). Estos Fs se caracterizan por ser eficientes productores de ERO, presentar máximos de absorción a longitudes de onda superiores a los 700 nm, estructuras químicas versátiles que posibilitan numerosas derivatizaciones a fin de incrementar el tiempo de vida de los estados excitados y potenciar la eficacia terapéutica.<sup>24,25,32,33</sup>

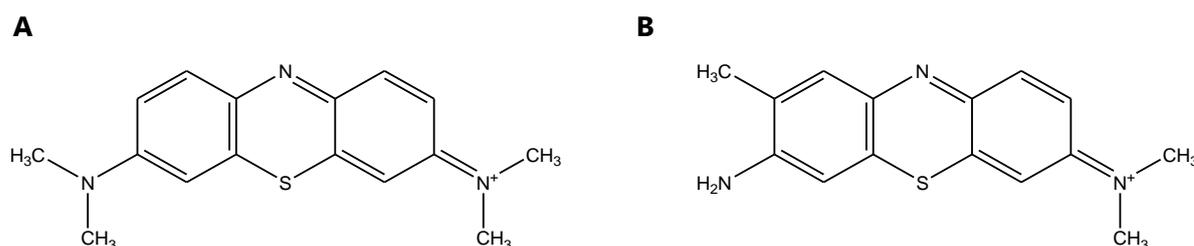


**Figura 6:** Estructura básica de los macrociclos porfirínicos.

### 3.1.2.2. Fotosensibilizadores no porfirínicos

El desarrollo de Fs no porfirínicos para su aplicación en el tratamiento fotodinámico se encuentra desfasado considerablemente con respecto a la evolución de los derivados de porfirina. Principalmente, se ha enfocado en compuestos catiónicos, tales como las fenotiazinas, que incluyen el Azul de Metileno (AM, **Figura 7A**) y el Azul de Toluidina (AT, **Figura 7B**). La carga positiva de estos compuestos les confiere alta selectividad por las

células cancerígenas y bacterianas. Numerosa bibliografía sostiene que el potencial de membrana mitocondrial de las células tumorales es más negativo que el correspondiente a las normales, por lo cual los Fs catiónicos quedan retenidos principalmente en las células a tratar.<sup>34</sup> Por otra parte, la pared celular de las bacterias posee componentes aniónicos que interaccionan fácilmente con fármacos catiónicos. Además, compuestos catiónicos ingresan lentamente a las células huésped mediante el proceso de endocitosis, mientras que su absorción en bacterias es relativamente rápida, lo que favorece la acumulación de los Fs en las células blanco.<sup>35</sup>



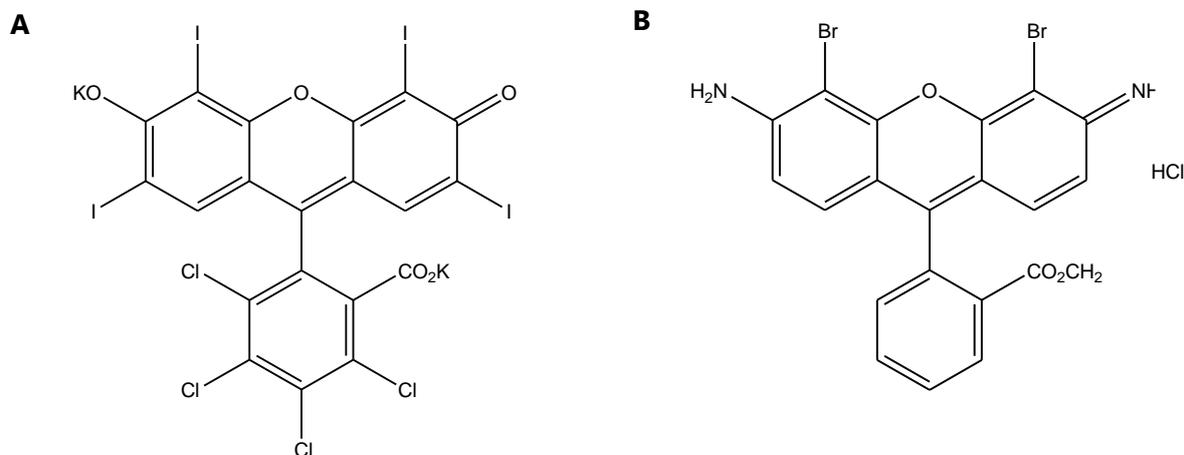
**Figura 7:** Estructura química de los Fs tiazínicos **(A)** AM y **(B)** AT.

Las fenotiazinas, también conocidas como tiazinas, presentan altos coeficientes de extinción molar entre 600 y 800 nm. El Fs, AM, ha sido aplicado en el tratamiento clínico de carcinoma de células basales y sarcoma de Kaposi. Además, existen ensayos *in vitro* de adenocarcinoma, carcinoma de vejiga y células tumorales cervicales. Por otra parte, el compuesto AT ha sido ampliamente estudiado frente a la inactivación de diversos microorganismos patógenos y ha presentado resultados alentadores en la fotoinactivación de bacterias *Gram*-positivas y *Gram*-negativas. Ambos Fs tiazínicos son actualmente evaluados para el tratamiento de la periodontitis crónica.<sup>24,30</sup>

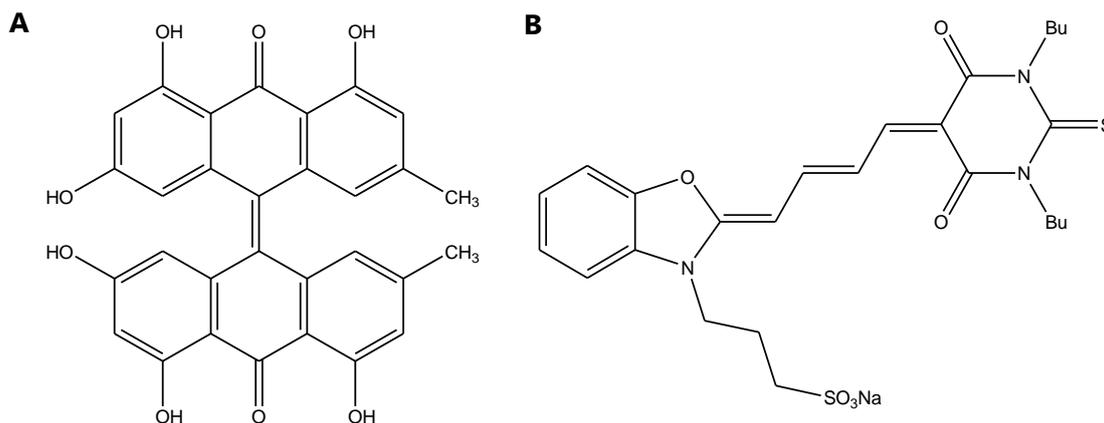
Como representantes de la familia de los xantenos se destacan Rosa de Bengala (RB, **Figura 8A**) y el éster metílico de 4,5 - dibromorodamina (TH9409, **Figura 8B**). La presencia de átomos de halógenos en la estructura de estos compuestos aumenta la eficiencia del cruce entre sistemas al  $^3\text{Fs}^*$  y favorece la producción de  $^1\text{O}_2$ . El compuesto RB ha demostrado buenos resultados en el tratamiento fotodinámico de carcinoma mamario y melanoma metastásico, mientras que TH9409 es eficaz frente a la enfermedad de injerto contra huésped, produciendo la destrucción de los linfocitos mediante apoptosis.<sup>24</sup>

Las antraquinonas y cianinas son otras de las familias de Fs no porfíricos más estudiadas. La Hipericina (**Figura 9A**) es una antraquinona natural con propiedades fotoquímicas definidas y presenta selectividad por las células tumorales. Por otra parte,

Merocianina 540 (**Figura 9B**) es el representante de las cianinas evaluado en TFD de leucemia y neuroblastoma.<sup>24</sup>



**Figura 8:** Estructura química de los derivados de los xantenos: (A) RB y (B) TH9402.

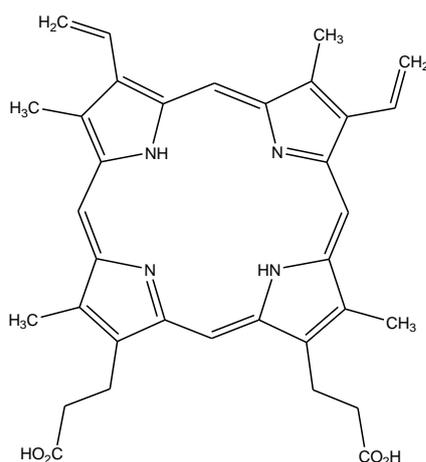


**Figura 9:** Estructura química de (A) Hipericina y (B) Merocianina 540.

### 3.1.2.3. Fotosensibilizador endógeno: precursores

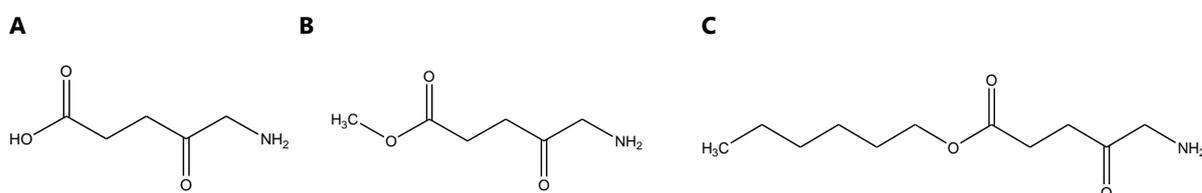
Una alternativa en el tratamiento fotodinámico es la administración de precursores metabólicos con el objetivo de inducir la generación de Protoporfirina IX (PpIX, **Figura 10**), un Fs endógeno.<sup>33</sup> Este compuesto es un intermediario en la biosíntesis de la hemoglobina (la proteína de unión al oxígeno en los glóbulos rojos) y la mioglobina (proteína que une el oxígeno a los músculos). En condiciones normales, la PpIX está presente en una concentración extremadamente baja para producir una reacción de fotosensibilización. Sin embargo, si se administra un exceso de ALA (**Figura 11A**), metabolito endógeno mitocondrial que se genera a partir de succinyl-CoA y glicina, se

estimula la síntesis de PpIX, el cual puede acumularse y aplicarse en el tratamiento fotodinámico de diferentes patologías. Si bien la mayoría de las células humanas expresan las enzimas implicadas en la síntesis de este Fs endógeno, la actividad enzimática de los tumores se diferencia de aquellas características de las células normales, lo que conduce a una mayor acumulación de PpIX en el tejido dañado, brindando selectividad al tratamiento.<sup>32,36</sup>



**Figura 10:** Estructura química del Fs endógeno PpIX.

Actualmente, la TFD con ALA y sus derivados, ALA-metil éster (MAL, **Figura 11B**) y ALA-hexil éster (HAL, **Figura 11C**), es un tratamiento aprobado para su aplicación en numerosas afecciones malignas y premalignas tales como queratosis actínica, carcinoma basocelular, enfermedad de Bowen y cáncer de vejiga, entre otras. Además, estos compuestos son eficaces en la detección de lesiones y la identificación de márgenes de resección quirúrgica, debido a que PpIX presenta intensa fluorescencia, cuando se excita con la luz violeta.<sup>24,32</sup>



**Figura 11:** Estructuras químicas de ALA (A), MAL (B) y HAL (C).

### 3.1.3. FOTOSENSIBILIZADORES DE TERCERA GENERACIÓN

La mayoría de los Fs de primera y segunda generación son de naturaleza aromática e hidrófoba, por lo que presentan pobre o limitada solubilidad en agua. En consecuencia,

estos compuestos se agregan fácilmente en condiciones fisiológicas, reduciendo significativamente los rendimientos cuánticos de la producción de ERO. Por otra parte, los Fs hidrofílicos no presentan una adecuada selectividad entre las células blanco y las normales para su aplicación clínica.<sup>37</sup> El uso de numerosos sistemas transportadores de Fs, también denominados nanopartículas, es un enfoque prometedor para superar estos inconvenientes. El empleo de nanomateriales puede ayudar a satisfacer los diferentes requisitos de un agente fototerapéutico ideal para su aplicación en TFD.<sup>22</sup> La combinación de Fs y diferentes sistemas de vectorización dio origen a los Fs de tercera generación, también conocidos como nanofotosensibilizadores.<sup>37</sup>

En los últimos años, la nanotecnología ha contribuido significativamente al desarrollo de nuevas formulaciones farmacéuticas que permitan incrementar la solubilidad, biodisponibilidad, absorción, distribución, metabolismo y excreción de fármacos, con la consecuente disminución de la toxicidad. Los sistemas transportadores de fármacos ofrecen varias ventajas sobre las formulaciones convencionales:<sup>19,37-39</sup>

- Protegen al agente terapéutico de la degradación prematura.
- Aumentan la solubilidad del fármaco, disminuyendo su agregación.
- Incrementan el tiempo de circulación del fármaco en el torrente sanguíneo.
- Mejoran la incorporación celular.
- Aumentan la selectividad hacia las células blanco.
- Previenen el eflujo mediante bombas de resistencia a múltiples fármacos.
- Posibilitan la co-administración de dos o más fármacos (incluyendo quimioterápicos) para la terapia de combinación.

A diferencia de los sistemas tradicionales de administración de fármacos, no se requiere que los nanofotosensibilizadores liberen las moléculas del Fs para evidenciar la acción terapéutica. En estas nuevas formulaciones farmacéuticas, es esencial que las ERO puedan difundir desde la matriz nanoparticulada para ejercer la fotosensibilización celular.<sup>37</sup> Numerosas estrategias de vehiculización han sido evaluadas con el objetivo de alcanzar una terapia altamente selectiva y efectiva. A continuación se detallan las características relevantes de los sistemas transportadores de fármacos, empleados en el desarrollo de Fs de tercera generación aplicables en TFD.

#### 3.1.3.1. Liposomas

Los liposomas son una de las primeras plataformas tecnológicas aplicadas para la vehiculización de fármacos. Actualmente, están disponibles numerosas formulaciones

liposomales aprobadas para diferentes usos medicinales y muchas más se encuentran en las etapas correspondientes a los estudios clínicos y preclínicos previos a su aprobación.<sup>25</sup> Estos sistemas consisten en vesículas concéntricas formadas por bicapas lipídicas cuyo componente principal son los fosfolípidos naturales o sintéticos. Su capacidad para vehicular fármacos hidrofílicos en su núcleo acuoso y agentes hidrofóbicos en la membrana envolvente, los convierte en excelentes vehículos terapéuticos (**Figura 12A**).<sup>37</sup>

Los liposomas son en la actualidad, los sistemas transportadores de fármacos con mayor aplicación en clínica y en particular son los vehículos más empleados en la vectorización de Fs.<sup>40</sup> La encapsulación de fármacos en liposomas ha proporcionado una valiosa oportunidad para incrementar la solubilidad de los agentes fotosensibilizantes en medios acuosos y mejorar su estabilidad química y fotoquímica. Al mismo tiempo, estos sistemas de vehiculización han permitido disminuir la agregación de los Fs, incrementando su actividad *in vitro* e *in vivo*, reduciendo su toxicidad y mejorando su biodistribución. Numerosos estudios demuestran que el empleo de liposomas en el desarrollo de Fs de tercera generación presenta mayores beneficios en comparación con otros sistemas de vehiculización, tales como micelas y nanopartículas poliméricas o metálicas, entre otros.<sup>41</sup>

Diferentes innovaciones tecnológicas han permitido modificar los liposomas convencionales, dando origen a una gran variedad de vesículas lipídicas con mayor vida media en el organismo y una liberación sitio específica del fármaco.<sup>42</sup>

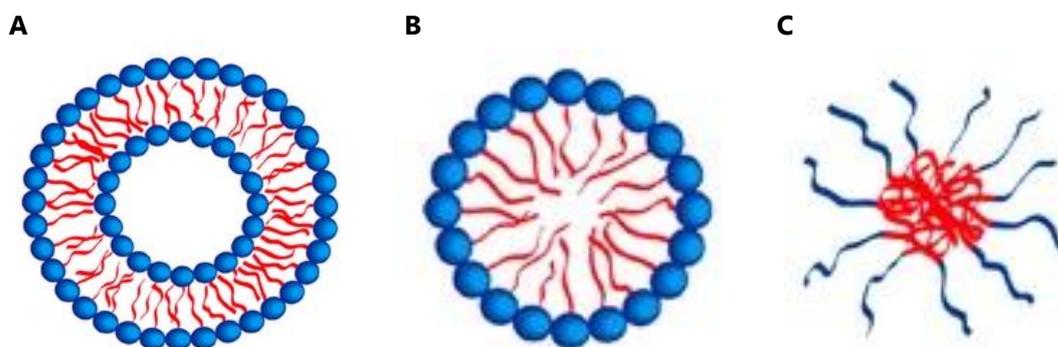
### 3.1.3.2. Micelas

Las micelas, junto a los liposomas, fueron los primeros sistemas estudiados con el objetivo de transportar Fs con aplicación fotodinámica. Las micelas son estructuras de monocapa formadas por tensioactivos anfífilicos o moléculas de copolímeros, en las que la cabeza hidrofílica está en contacto con la fase acuosa (típicamente el disolvente circundante) y las colas hidrófobas se dirigen al centro (**Figura 12B y 12C**).<sup>19</sup> Generalmente se aplican al transporte de Fs hidrofóbicos, que pueden incorporarse físicamente o unirse covalentemente al núcleo hidrófobo. La región externa de la envoltura formada por los segmentos hidrófilos mantiene una interface de estabilización entre el compartimento hidrófobo y el entorno acuoso, permitiendo así solubilizar los Fs hidrofílicos y anfífilicos.<sup>43</sup>

Las micelas poliméricas han sido ampliamente utilizadas en los últimos años debido a la mayor estabilidad que presentan, en comparación con los sistemas micelares basados en

agentes tensioactivos convencionales. Esta propiedad puede atribuirse a la presencia de múltiples sitios de interacción hidrófobos en la cadena polimérica. Estos sistemas se preparan frecuentemente por asociación de copolímeros dispersos en un medio acuoso, formando partículas con diámetros inferiores a 100 nm, esto le confiere buena biodisponibilidad y acumulación en el sitio de acción.<sup>19</sup>

En la TFD, las micelas poliméricas han sido ampliamente investigadas como una plataforma alternativa para el suministro de Fs hidrófobos y presenta varias ventajas, tales como preparación simple, carga eficiente del fármaco sin modificación química y liberación controlada.<sup>43</sup> Además, estudios previos revelaron que el efecto secundario de fotosensibilidad cutánea ocasionada por el tratamiento con diferentes porfirinas y ftalocianinas no se evidenció con la administración de las correspondientes formulaciones micelares.<sup>44</sup>

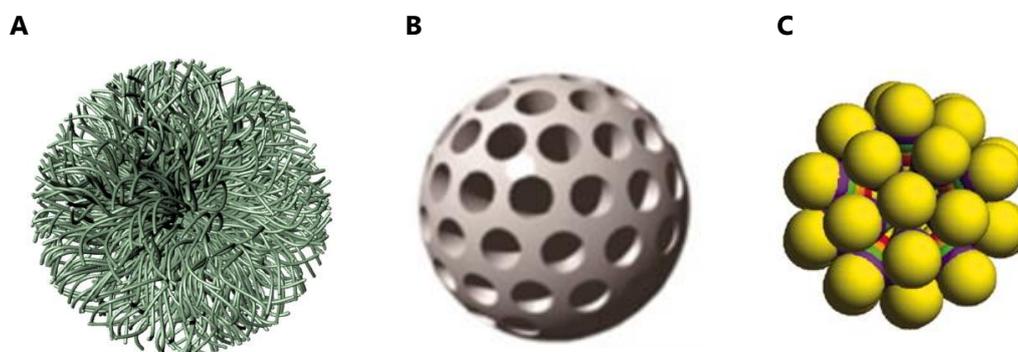


**Figura 12:** Sistemas transportadores de fármacos empleados en el desarrollo de Fs de tercera generación: Liposomas (A); micelas de agentes tensioactivos (B) y micelas poliméricas (C).

### 3.1.3.3. Nanopartículas sólidas

Las nanopartículas sólidas son sistemas transportadores de fármacos de tamaño sub-micrométrico, que han surgido recientemente como una nueva y prometedora herramienta para la administración de fármacos en TFD.<sup>22,39</sup> Estos sistemas de vehiculización ofrecen numerosas ventajas sobre los Fs de segunda generación tales como la capacidad para suministrar una gran cantidad de fármaco en las células dianas, prevenir la degradación en el entorno biológico e incorporar múltiples componentes como agentes de contraste y ligandos con la finalidad de incrementar la selectividad. Estas ventajas representan un gran potencial que permitiría mejorar numerosos aspectos de la TFD tales como la selectividad y la hidrofobicidad de los Fs.<sup>45</sup>

Las nanopartículas sólidas pueden estar constituidas por polímeros, metales, lípidos y cerámicas, entre otros materiales, dando origen a una gran variedad de sistemas transportadores de fármacos. Los más utilizados en el desarrollo de Fs de tercera generación son las nanopartículas poliméricas, de sílice y de oro (**Figura 13**).<sup>39,46</sup>



**Figura 13:** Nanopartículas sólidas empleados en el desarrollo de Fs de tercera generación: nanopartículas poliméricas (**A**); nanopartículas de sílice (**B**) y nanopartículas de oro (**C**).

Las nanopartículas basadas en polímeros (**Figura 13A**) se consideran sistemas de vectorización de fármacos más atractivos que los liposomales y los micelares, debido a su mayor estabilidad y pequeño diámetro, lo que impide su reconocimiento por los macrófagos y las proteínas, permitiendo así un tiempo prolongado de circulación plasmática. Además, estos vehículos pueden incorporar mayor cantidad de Fs y ofrecen un mejor control sobre el proceso de liberación. La matriz polimérica protege al fármaco de entornos agresivos tales como luz, pH y procesos de degradación enzimáticos.<sup>19</sup> Los fármacos hidrófobos pueden ser atrapados fácilmente en el núcleo de las nanopartículas poliméricas, mediante interacciones hidrofóbicas o electrostáticas con los polímeros.<sup>37</sup> Los componentes de estos nanosistemas deben tener una buena biocompatibilidad. Entre los más empleados en el transporte de ingredientes farmacéuticos activos se destacan poli (ácido láctico), poli (ácido glicólico) y su copolímero. Además, es importante resaltar la aplicación de compuestos naturales tales como quitosano, alginato, albúmina y colágeno.<sup>45</sup>

Las nanopartículas de sílice (**Figura 13B**) presentan numerosas ventajas en comparación con los sistemas poliméricos, incluyendo su naturaleza no tóxica, propiedades inertes y estables. Debido a que no son biodegradables, el tamaño de partícula debe ser cuidadosamente controlado para asegurar su eliminación del organismo a través del riñón y evitar su captura por el sistema retículo-endotelial (SRE). Debido a su elevada

porosidad, las nanopartículas de sílice tienen una alta capacidad de carga de los Fs y contribuyen significativamente a la eficacia de la TFD. Los poros de estas nanopartículas son lo suficientemente pequeños para bloquear la liberación del fármaco, pero son permeables al oxígeno molecular y al  $^1\text{O}_2$  generado. En consecuencia, esta ERO puede generarse eficientemente mediante la irradiación con luz adecuada, atravesar la superficie intrínsecamente porosa de la nanopartícula y causar un daño significativo en las células tratadas.<sup>37,45</sup>

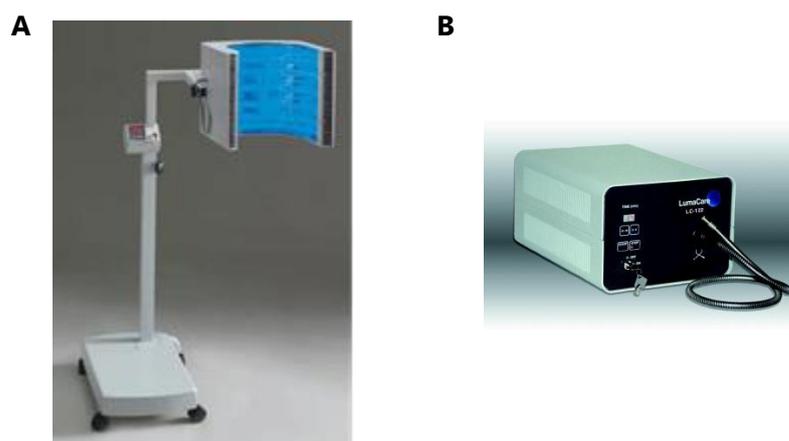
Las nanopartículas de oro (**Figura 13C**) se han explorado en diferentes aplicaciones biomédicas desde hace más de 40 años. Numerosas biomoléculas y fármacos pueden unirse fácilmente a la superficie de estos sistemas, transformándolos en alternativas interesantes para el desarrollo de materiales multifuncionales con aplicación en los tratamientos del cáncer y otras patologías.<sup>19</sup> Las nanopartículas de oro incrementan el campo de la luz incidente a su alrededor, debido al efecto de resonancia de plasmón de superficie localizada, lo que podría aumentar la eficiencia de excitación del Fs que transportan.<sup>25</sup> Estudios previos demostraron que la vehiculización de porfirinas, ftalocianinas y tiazinas en nanopartículas de oro incrementó el tiempo de circulación sanguínea, el suministro selectivo a los tejidos tumorales, el rendimiento cuántico de generación de  $^1\text{O}_2$  y la actividad fotodinámica de los Fs libres.<sup>19</sup>

### 3.2. FUENTES DE LUZ

Las fuentes de luz empleadas en el tratamiento fotodinámico deben presentar características espectrales adecuadas que coincidan con el intervalo de longitudes de onda de máxima absorción del Fs, con el fin de generar niveles adecuados de ERO para producir efecto citotóxico.<sup>17</sup> La mayoría de los Fs se activan con luz roja entre 630 y 700 nm, la cual tiene un poder de penetración en los tejidos entre 0,5 cm (a 630 nm) y 1,5 cm (a 700 nm).<sup>23</sup> El desarrollo de sistemas de irradiación y de dispositivos de administración apropiados, con los pertinentes parámetros dosimétricos, son los componentes claves de la práctica clínica de la TFD. La entrega exacta de luz al tejido blanco podría lograrse mediante una combinación técnica de fuentes de luz adecuadas y dispositivos óptimos de suministro de fibra óptica, consistentes en fibras de cuarzo con puntas difusoras cilíndricas de diferentes longitudes y flexibilidad o fibra óptica con una lente.<sup>18</sup>

Las primeras fuentes de luz aplicadas en TFD fueron de luz no coherentes, las cuales incluyen lámparas de filamento de tungsteno, halógeno de cuarzo, arco de xenón, haluro metálico y lámparas de sodio revestidas de fósforo. Estos sistemas son adecuados para el tratamiento de grandes áreas, siendo los más seguros, fáciles de utilizar y de menor

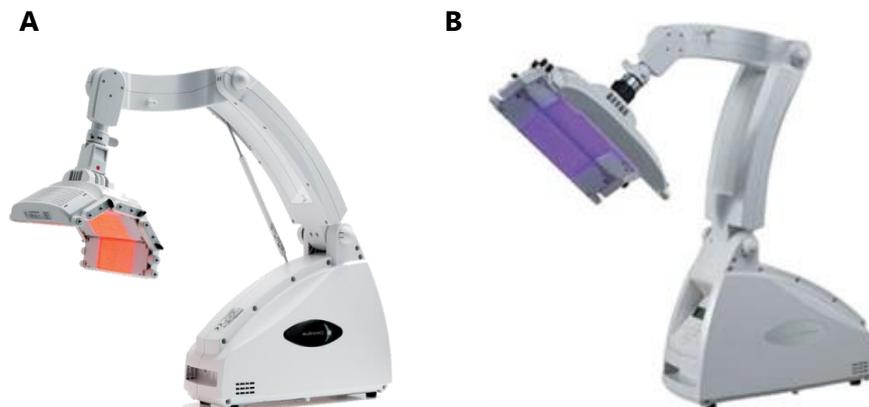
costo. Estas fuentes de luz pueden producir espectros de longitudes de onda amplios, por lo que se utilizan conjuntamente con filtros ópticos para acotar el rango de irradiación. Las desventajas de las lámparas convencionales incluyen efecto térmico significativo, baja intensidad de luz y dificultad para controlar la dosis. Sin embargo, en la actualidad, la mayoría de estos inconvenientes pueden ser superados por un diseño de ingeniería cuidadoso. Por ejemplo, BLU-U<sup>®</sup> (**Figura 14A**) es un sistema de iluminación que emite a 400 nm y está aprobado para el tratamiento de queratosis actínica con ALA en rostro y cuero cabelludo. La lámpara LumaCare<sup>™</sup> (**Figura 14B**), es un sistema de irradiación portátil y compacto, que proporciona sondas de fibra óptica intercambiables que contienen una serie de lentes y filtros ópticos. Este dispositivo puede emitir luz entre 350-800 nm, con potencia variable, lo que posibilita la activación de una amplia gama de Fs.<sup>23,24,47</sup>



**Figura 14:** Fuentes de luz no coherente utilizadas en TFD. (A) Blu-U<sup>®</sup> y (B) LumaCare<sup>™</sup>.

Los diodos emisores de luz (LED, sigla en inglés) son sistemas emergentes para la aplicación de luz en el tratamiento fotodinámico. Un LED es una fuente de luz direccional con la máxima potencia emitida de manera perpendicular a la superficie emisora. Son sistemas compactos, livianos, no emiten calor, requiere poca energía para producir irradiaciones a diferentes longitudes de onda y se puede montar en una amplia gama de geometrías y tamaños. Dependiendo de la profundidad de las patologías a tratar, los LED pueden implantarse en el extremo de diferentes catéteres hasta conformar pantallas para la irradiación de grandes superficies. Dentro de los equipos de irradiación LED se destacan Omnilux reactive<sup>™</sup> (633nm, **Figura 15A**), indicado para TFD de cáncer de piel, y Omnilux

Blue <sup>TM</sup> (415nm, **Figura 15B**), aprobado para el tratamiento del acné y queratosis actínica.<sup>48</sup>



**Figura 15:** Fuentes de luz LED utilizadas en TFD. **(A)** Omnilux reactive <sup>TM</sup> y **(B)** Omnilux Blue <sup>TM</sup>.

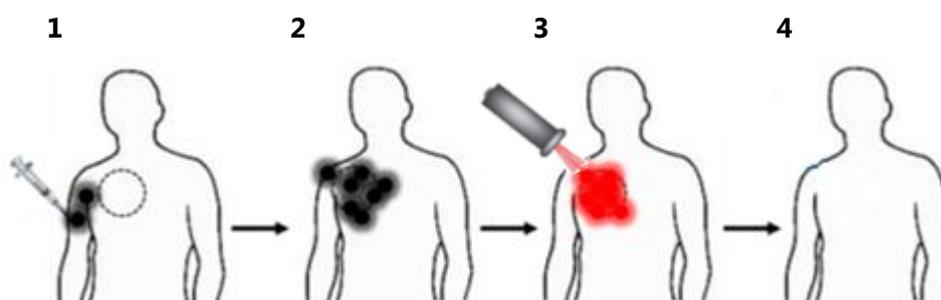
Sin embargo, las fuentes de luz más utilizadas en los tratamientos fotodinámicos son los láseres. Estos sistemas producen luz monocromática de alta energía, a una longitud de onda específica para un  $F_s$  determinado. La luz láser puede ser transmitida a través de una fibra óptica y suministrada directamente al sitio de acción a través de una microlente o un difusor cilíndrico o esférico. En TFD se han utilizado láseres de colorante-Argón, de fosfato de titanio y potasio (KTP), de vapor de metal y, más recientemente, láseres de diodo. Estos últimos son portátiles, livianos y menos costosos que los anteriores. Diomed 630 PDT (**Figura 16**), láser de diodo que emite luz a 630 nm, obtuvo la aprobación para el uso con Photofrin<sup>®</sup> en el tratamiento de malignidades esofágicas y pulmonares.<sup>18,47</sup>



**Figura 16:** Fuente de laser de diodos utilizadas en TFD. Diomed 630 PDT.

#### 4. TRATAMIENTO FOTODINÁMICO

La TFD es una modalidad terapéutica en auge debido a que presenta numerosas ventajas sobre los tratamientos convencionales. Es una técnica mínimamente invasiva, ambulatoria, que presenta baja toxicidad sistémica y puede aplicarse repetidamente en el sitio de acción. Tiene un atractivo particular en oncología porque puede combinarse con quimioterapia, radiación ionizante o cirugía. Además, el tratamiento fotodinámico presenta selectividad dual, depende de la capacidad que presenta el Fs para acumularse en el sitio de acción y de la activación localizada del mismo, como consecuencia de la irradiación específica de la zona afectada.<sup>10,25,37,49</sup> A fin de alcanzar la máxima eficacia terapéutica, el procedimiento clínico de la TFD involucra cuatro etapas, tal como se muestra en la **Figura 17**.<sup>24,50</sup>



**Figura 17:** Procedimiento clínico de la TFD.

**1-** Se administra el Fs al paciente, generalmente por vía tópica o intravenosa, según la afección a tratar y en función de las propiedades del agente terapéutico.

**2-** Se permite que transcurran entre 3 y 96 horas antes de proceder a la iluminación de la zona afectada. De este modo, se alcanzan niveles de acumulación diferencial del Fs en el tejido anormal respecto al sano. El tiempo de espera permite que el fármaco se distribuya en el organismo, se localice selectivamente en las células afectadas, debido a diferencias fisiológicas con el tejido normal, y se elimine adecuadamente del paciente.

**3-** Se irradia localmente la zona afectada empleando una fuente de irradiación apropiada para el tratamiento fotodinámico. Es importante destacar que la dosis de luz suministrada debe ser suficientemente alta como para causar una respuesta eficaz.

**4-** Se desencadenan una serie de reacciones intracelulares, que dan origen a la formación de ERO (Sección 2 de este Capítulo) que producen un daño biológico irreversible en la zona tratada, conduciendo a la muerte celular.

La destrucción celular puede desencadenarse por distintas vías.<sup>10,24</sup>

- *Lipoperoxidación de la membrana: los lípidos que constituyen la membrana mitocondrial, lisosomal y del retículo endoplásmático celular pueden ser oxidados por las diferentes ERO generadas durante el tratamiento fotodinámico, lo que ocasiona la muerte por necrosis o apoptosis.*
- *Injuria endotelial: daño a la vasculatura con contracción arteriolar, trombosis venular y estasis de flujo sanguíneo con carencia nutricional y muerte celular.*
- *Inflamación: proceso inducido por la degradación de los fosfolípidos y liberación de mediadores inflamatorios con acumulación de macrófagos y neutrófilos. La degranulación de los neutrófilos incrementa el estrés oxidativo, libera enzimas lisosomales y agentes quimiotácticos.*

Si bien la implementación de la TFD ha mejorado considerablemente la calidad y la esperanza de vida de los pacientes con cáncer y otras patologías no oncológicas, se requieren nuevos avances en la selectividad y la eficacia terapéutica a fin de superar numerosos efectos secundarios relacionados con la TFD clásica, principalmente la fotosensibilidad cutánea que limita la exposición solar de los pacientes con posterioridad al tratamiento.<sup>24,37</sup>

## **5. APLICACIONES TERAPÉUTICA**

La TFD ha experimentado un crecimiento vertiginoso en los últimos años debido a su potencial para el tratamiento de una amplia variedad de situaciones clínicas, entre las cuales cabe destacar el tratamiento curativo y paliativo de numerosas patologías oncológicas y no oncológicas. A continuación se detallan los principales resultados obtenidos con el tratamiento fotodinámico.

### **5.1. ONCOLÓGICAS**

La TFD presenta antecedentes en el abordaje de una gran variedad de tumores sólidos.<sup>20</sup> Los principales avances se centraron en el tratamiento de afecciones superficiales, tales como el carcinoma superficial de células basales, queratosis actínica y enfermedad de Bowen, debido a las limitaciones de los sistemas de irradiación y la restringida penetración de la luz en los tejidos. Los Fs, ALA y MAL, fueron los más utilizados en la terapia de estas patologías.<sup>51</sup> Además ALA presentó resultados prometedores en el tratamiento de la enfermedad de Paget y de ciertos tumores cerebrales, como los

gliomas.<sup>26,52</sup> Por otra parte, Photofrin® se aprobó para la terapia del cáncer temprano de pulmón y esófago, conducto biliar, vejiga, cerebro y ovario, mientras que el derivado porfirínico, Temoporfin, demostró buenos resultados en el tratamiento paliativo del cáncer en ductos biliares, bronquios, cabeza y cuello.<sup>26</sup> Algunos Fs emiten fuertes señales de fluorescencia bajo irradiación con luz de longitudes de onda específicas. Esta propiedad sustenta las bases del Diagnóstico por Fluorescencia, el cual ayuda a visualizar la localización de los tumores como así también, los márgenes entre el tejido afectado y el sano.<sup>53</sup>

## 5.2. NO ONCOLÓGICAS

Si bien la TFD ha estado principalmente enfocada al tratamiento del cáncer, en los últimos años se profundiza el estudio de nuevas aplicaciones en diferentes campos no oncológicos:

- *Enfermedades infecciosas:* la inactivación fotodinámica de bacterias, virus y hongos es una alternativa exitosa para sortear la resistencia de los microorganismos a las terapias convencionales. Particularmente, esta modalidad terapéutica se denomina Terapia Fotodinámica Antimicrobiana (TFDA), Inactivación Fotodinámica o Quimioterapia Antimicrobiana Fotodinámica.<sup>54</sup> Diferentes bacterias *gram*-negativas y *gram*-positivas, en estado planctónico y formando *biofilms*, han sido tratadas con numerosos Fs, evidenciando resultados prometedores.<sup>55,56</sup> Principalmente los compuestos catiónicos fueron capaces de inactivar a ambos microorganismos sin la necesidad de permeabilizar la membrana externa utilizando cloruro cálcico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o polimixina B. Las causas de este comportamiento podrían atribuirse a la interacción electrostática que mantiene unidos a los Fs con carga positiva y los grupos negativos de la membrana externa de las bacterias.<sup>50</sup>

Por otra parte, se ha demostrado que los virus de la hepatitis A, B, de la inmunodeficiencia humana y del Nilo Occidental, como así también los parvovirus son inactivados mediante el tratamiento fotodinámico de los componentes de la sangre con AM.<sup>57</sup>

- *Oftalmología:* la degeneración macular asociada a la edad es una de las principales causas de ceguera en personas de más de 50 años y se debe a un rápido crecimiento anormal de vasos sanguíneos en la retina. La ruptura de estos vasos produce una progresiva pérdida de la capacidad visual y en el 80-90% de los casos no existe ninguna

modalidad terapéutica adecuada para lograr la regresión. Visudyne® fue aprobado internacionalmente para el tratamiento de esta patología.<sup>50,58</sup>

- *Dermatología:* mediante la TFD se tratan enfermedades dermatológicas no oncológicas como psoriasis, malformaciones vasculares, morfea, sarcoidosis y acné. Por otra parte, el "Rejuvenecimiento Fotodinámico" se ha convertido en una técnica habitual para la prevención y tratamiento del fotoenvejecimiento. Los signos visibles de esta afección son la aparición de hiperpigmentaciones, telangiectasias, arrugas superficiales y pérdida de elasticidad de la piel. En todos los casos, el procedimiento terapéutico empleado, consiste principalmente en la administración tópica de ALA e irradiación apropiada con diferentes fuentes de luz.<sup>50,59</sup>

- *Ginecología:* el tratamiento fotodinámico del endometrio es una alternativa a la histerectomía para mujeres con hemorragias uterinas disfuncionales.<sup>50</sup> Estudios preliminares proponen a la TFD como una alternativa terapéutica para pacientes con embarazo extrauterino y endometriosis. Sin embargo, es necesario profundizar estos ensayos para evaluar potenciales daños y efectos adversos, antes de aplicar la TFD a seres humanos.<sup>60</sup>

- *Arteriosclerosis:* la posibilidad de tratar esta enfermedad con la TFD se basa en el hecho de que las placas de ateroma, en las arterias dañadas, retienen concentraciones más elevadas de porfirinas que la pared vascular normal.<sup>50</sup> El tratamiento fotodinámico con ALA podría reducir el contenido de macrófagos e inhibir la progresión de la placa, indicando un enfoque prometedor para tratar la placa aterosclerótica inflamada. Esta modalidad terapéutica previene o inhibe la reestenosis después de la colocación de una endoprótesis vascular (*stent*).<sup>61</sup>

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Arweiler N, Pietruska M, Pietruski J, Skurska A, Dolińska E, Heumann C et al. Six-month results following treatment of aggressive periodontitis with antimicrobial photodynamic therapy or amoxicillin and metronidazole. *Clinical Oral Investigations* 2014; 18: 2129–2135.
- 2 Allison RR, Moghissi K. Oncologic photodynamic therapy: Clinical strategies that modulate mechanisms of action. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2013; 10: 331–341.
- 3 Plaetzer K, Berneburg M, Kiesslich T, Maisch T. New applications of photodynamic therapy in biomedicine and biotechnology. *BioMed Research International* 2013; : Article ID 161362.

- 4 Taylor VM, Cedeño DL, Robledo SM. Fototerapia para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. *Infectio* 2011; 15: 277–288.
- 5 Abdel-Kader MH. *Photodynamic therapy: from theory to application*. Springer: New York, 2014.
- 6 Baltazar LM, Ray A, Santos DA, Cisalpino PS, Friedman AJ, Nosanchuk JD. Antimicrobial photodynamic therapy: An effective alternative approach to control fungal infections. *Frontiers in Microbiology* 2015; 6: 1–11.
- 7 Cengel KA, Simone CB, Glatstein E. PDT: What's past is prologue. *Cancer Research* 2016; 76: 2497–2499.
- 8 Kamath V, Pai JS, Chandran S, Jaiswal N. Periowand: Photodynamic therapy in periodontics. *Universal Research Journal of Dentistry* 2014; 4: 133.
- 9 Hayley P, Stamati I, Yahioğlu G, Butt M, Deonarain M. Antibody-Directed Phototherapy (ADP). *Antibodies* 2013; 2: 270–305.
- 10 Allevato MA. Terapia Fotodinámica (1° parte). *Act Terap dermatol* 2006; 29: 302–312.
- 11 ANMAT. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Acceso: Noviembre de 2016. Disponible en la Web: [http://www.anmat.gov.ar/boletin\\_anmat/agosto\\_2012/Dispo\\_4976-12.pdf](http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/agosto_2012/Dispo_4976-12.pdf).
- 12 ANMAT. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Acceso: Noviembre de 2016. Disponible en la Web: [http://www.anmat.gov.ar/ESPECMED/diciembre/certificados\\_monofarmacos\\_07.asp](http://www.anmat.gov.ar/ESPECMED/diciembre/certificados_monofarmacos_07.asp).
- 13 ANMAT. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Acceso: Noviembre de 2016. Disponible en la Web: [http://www.anmat.gov.ar/ESPECMED/febrero/certificados\\_monofarmacos07.asp](http://www.anmat.gov.ar/ESPECMED/febrero/certificados_monofarmacos07.asp).
- 14 ANMAT. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Acceso: Noviembre de 2016. Disponible en la Web: [http://www.anmat.gov.ar/EspeMed/noviembre/especmec\\_monofarmacos\\_07.asp](http://www.anmat.gov.ar/EspeMed/noviembre/especmec_monofarmacos_07.asp).
- 15 ANMAT. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Acceso: Noviembre de 2016. Disponible en la Web: [http://www.anmat.gov.ar/EspeMed/abril/especmec\\_monofarmacos\\_08.asp](http://www.anmat.gov.ar/EspeMed/abril/especmec_monofarmacos_08.asp).
- 16 Kamkaew A, Lim SH, Lee HB, Kiew LV, Chung LY, Burgess K. BODIPY dyes in photodynamic therapy. *Chemical Society reviews* 2013; 42: 77–88.
- 17 Robertson CA, Evans DH, Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2009; 96: 1–8.
- 18 Yoon I, Li JZ, Shim YK. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clinical Endoscopy* 2013; 46: 7–23.
- 19 Deda DK, Araki K. Nanotechnology, light and chemical action: An effective combination to kill cancer cells. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2015; 26: 2448–2470.
- 20 Hu Z, Nancy O and, Hamblin MR. Photodynamic therapy as an emerging treatment modality for cancer and non-cancer diseases. *J Anal Bioanal Tech* 2014; : 1–3.
- 21 Jiang Z, Shao J, Yang T, Wang J, Jia L. Pharmaceutical development, composition and

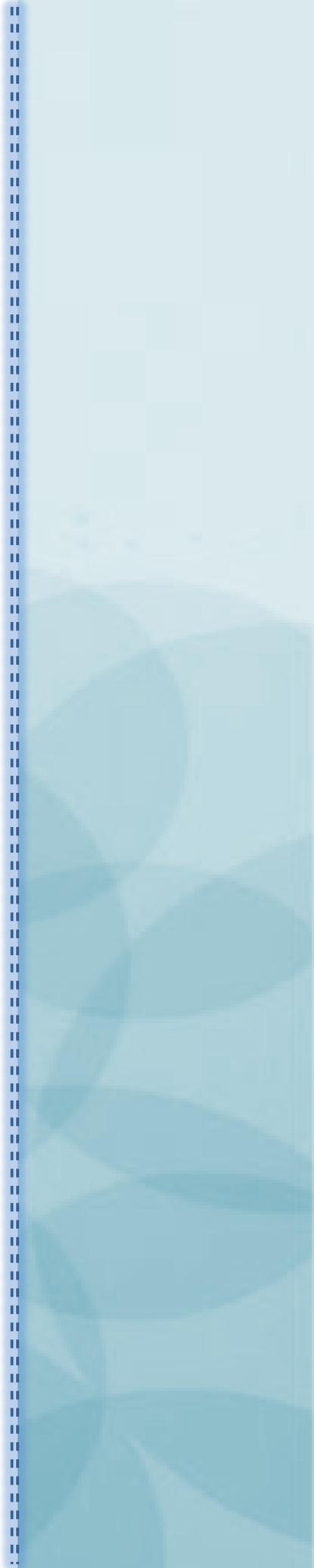
- quantitative analysis of phthalocyanine as the photosensitizer for cancer photodynamic therapy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2014; 87: 98–104.
- 22 Bechet D, Couleaud P, Frochot C, Viriot ML, Guillemin F, Barberi-Heyob M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends in Biotechnology* 2008; 26: 612–621.
- 23 Veerendra NR, Rekha RK, Chandana G, Sangeeta S. Photodynamic Therapy. *Indian journal of dental advancements* 2009; 1: 46–50.
- 24 Ormond AB, Freeman HS. Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials* 2013; 6: 817–840.
- 25 Lucky SS, Soo KC, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy. *Chemical Reviews* 2015; 115: 1990–2042.
- 26 Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO et al. Photodynamic therapy of cancer: An update. *American Cancer Society* 2011; 61: 250–281.
- 27 Banerjee SM, MacRobert AJ, Mosse CA, Periera B, Bown SG, Keshtgar MRS. Photodynamic therapy: Inception to application in breast cancer. *The Breast* 2017; 31: 105–113.
- 28 O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology* 2009; 85: 1053–1074.
- 29 Konan YN, Gurny R, Allémann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2002; 66: 89–106.
- 30 Oniszczyk A, Wojtunik-kulesza KA, Oniszczyk T, Kasprzak K. The potential of photodynamic therapy (PDT) — Experimental investigations and clinical use. 2016; 83: 912–929.
- 31 Ethirajan M, Chen Y, Joshi P, Pandey RK. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. *Chemical Society reviews* 2011; 40: 340–362.
- 32 Wachowska M, Muchowicz A, Firczuk M, Gabrysiak M, Winiarska M, Wańczyk M et al. Aminolevulinic acid (ala) as a prodrug in photodynamic therapy of cancer. *Molecules* 2011; 16: 4140–4164.
- 33 Samanamú C, Ninán O, Santiago J. Terapia fotodinamica una luz de esperanza en la lucha contra el cancer. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química* 2003; 6: 69–78.
- 34 Yue C, Yang Y, Zhang C, Alfranca G, Cheng S, Ma L et al. ROS-Responsive mitochondria-targeting blended nanoparticles: Chemo- and photodynamic synergistic therapy for lung cancer with on-demand drug release upon irradiation with a single light source. *Theranostics* 2016; 6: 2352–2366.
- 35 Kiesslich T, Gollmer A, Maisch T, Berneburg M, Plaetzer K. A comprehensive tutorial on in vitro characterization of new photosensitizers for photodynamic antitumor therapy and photodynamic inactivation of microorganisms. *BioMed Research International* 2013: Article ID 840417.
- 36 Marcu L, French PMW, Elson DS. Fluorescence lifetime spectroscopy and imaging: principles and applications in biomedical diagnostics. CRC Press: Florida, Estados

- Unidos, 2015.
- 37 Lim CK, Heo J, Shin S, Jeong K, Seo YH, Jang WD et al. Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of Cancer. *Cancer Letters* 2013; 334: 176–187.
  - 38 Farokhzad OC, Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano* 2009; 3: 16–20.
  - 39 Calixto GM, Bernegossi J, de Freitas LM, Fontana CR, Chorilli M. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. *Molecules* 2016; 21: 342.
  - 40 Lehner R, Wang X, Marsch S, Hunziker P. Intelligent nanomaterials for medicine: Carrier platforms and targeting strategies in the context of clinical application. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2013; 9: 742–757.
  - 41 Yang YT, Chen CT, Tsai T. Absorption and fluorescence spectral properties of hematoporphyrin in liposomes, micelles, and nanoparticles. *Dyes and Pigments* 2013; 96: 763–769.
  - 42 Nag OK, Awasthi V. Surface engineering of liposomes for stealth behavior. *Pharmaceutics* 2013; 5: 542–569.
  - 43 Li L, Huh K, Hamblin M, Mróz P, Juarranz A, Jaen P et al. Polymeric nanocarrier systems for photodynamic therapy. *Biomaterials Research* 2014; 18: 19.
  - 44 Gibot L, Lemelle A, Till U, Moukarzel B, Mingotaud AF, Pimienta V et al. Polymeric micelles encapsulating photosensitizer: Structure/photodynamic therapy efficiency relation. *Biomacromolecules* 2014; 15: 1443–1455.
  - 45 Huang Y-Y, Sharma SK, Dai T, Chung H, Yaroslavsky A, Diaz MG et al. Can nanotechnology potentiate photodynamic therapy? *Nanotechnology Rev* 2012; 1: 111–146.
  - 46 Schwiertz J, Wiehe A, Gräfe S, Gitter B, Epple M. Calcium phosphate nanoparticles as efficient carriers for photodynamic therapy against cells and bacteria. *Biomaterials* 2009; 30: 3324–3331.
  - 47 Huang Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy. *Technology in cancer research & treatment* 2005; 4: 283–93.
  - 48 Opel DR, Hagstrom E, Pace AK, Sisto K, Hirano-Ali SA, Desai S et al. Light-emitting diodes: A brief review and clinical experience. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology* 2015; 8: 36–44.
  - 49 Chatterjee DK, Fong LS, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008; 60: 1627–1637.
  - 50 Arad O, Gavalda A, Rey O, Rubio N, Sanchez-Garcia D, Borrell J et al. Porphycene for cancer photochemotherapy and other biomedical applications. *Afinidad* 2002; 59: 343–356.
  - 51 Tierney E, Barker A, Ahdout J, Hanke CW, Moy RL, Kouba DJ. Photodynamic therapy for the treatment of cutaneous neoplasia, inflammatory disorders, and photoaging. *American Society for Dermatologic Surgery* 2009; 35: 725–746.
  - 52 Gao Y, Zhang X cun, Wang W sheng, Yang Y, Wang H lin, Lu Y gang et al. Efficacy and

- safety of topical ALA-PDT in the treatment of EMPD. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2015; 12: 92–97.
- 53 Low KP, Bhuvanewari R, Thong PS, Bunte RM, Soo KC. Novel delivery of Chlorin e6 using anti-EGFR antibody tagged virosomes for fluorescence diagnosis of oral cancer in a hamster cheek pouch model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2016; 83: 143–154.
- 54 Baltazar LM, Ray A, Santos DA, Cisalpino PS, Friedman AJ, Nosanchuk JD. Antimicrobial photodynamic therapy: An effective alternative approach to control fungal infections. *Frontiers in Microbiology* 2015; 6: 1–11.
- 55 Meerovich GA, Tiganova IG, Makarova EA, Meerovich IG, Romanova M, Tolordova ER et al. Photodynamic inactivation of bacteria and biofilms using cationic bacteriochlorins. *Journal of Physics: Conference Series* 2016; 691: 012011.
- 56 Mamone L, Ferreyra DD, Gándara L, Di Venosa G, Vallecorsa P, Sáenz D et al. Photodynamic inactivation of planktonic and biofilm growing bacteria mediated by a meso-substituted porphyrin bearing four basic amino groups. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2016; 161: 222–229.
- 57 Denis TGS, Hamblin MR. An introduction to photoantimicrobials: Photodynamic therapy as a novel method of microbial pathogen eradication. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* 2011: 675–683.
- 58 Athanasakis K, Fragoulakis V, Tsiantou V, Masaoutis P, Maniadakis N, Kyriopoulos J. 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. *Clinical Therapeutics* 2012; 34: 446–456.
- 59 Gilaberte Y, Serra-Guillén C, De Las Heras ME, Ruiz-Rodríguez R, Fernández-Lorente M, Benvenuto-Andrade C et al. Terapia fotodinámica en dermatología. *Actas Dermo-Sifiliográficas* 2006; 97: 83–102.
- 60 Shishkova N, Kuznetsova O, Berezov T. Photodynamic therapy for gynecological diseases and breast cancer. *Cancer biology & medicine* 2012; 9: 9–17.
- 61 Peng C, Li Y, Liang H, Cheng J, Li Q, Sun X et al. Detection and photodynamic therapy of inflamed atherosclerotic plaques in the carotid artery of rabbits. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2011; 102: 26–31.

## **CAPÍTULO 2**

### **SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE FOTOSENSIBILIZADORES DE SEGUNDA GENERACIÓN**



## 1. DISEÑO DE FOTOSENSIBILIZADORES DE SEGUNDA GENERACIÓN

Un Fs clínicamente exitoso debe cumplir una serie de requisitos detallados en la Sección 3.1., Capítulo 1. Frente al desafío de optimizar las propiedades de los Fs de primera y segunda generación disponibles, numerosos investigadores evaluaron el efecto de diferentes modificaciones estructurales sobre las propiedades fisicoquímicas, fotofísicas y fotoquímicas de estos fármacos.<sup>1-3</sup> Principalmente se enfocaron en incrementar la acumulación selectiva del agente fototerapéutico en células o tejidos afectados, producir corrimientos batocrómicos de la longitud de onda de máxima absorción ( $\lambda_{\max}$ ) del Fs y mejorar el rendimiento cuántico de formación de  $^1\text{O}_2$  ( $\phi_{\Delta}$ ).<sup>4</sup>

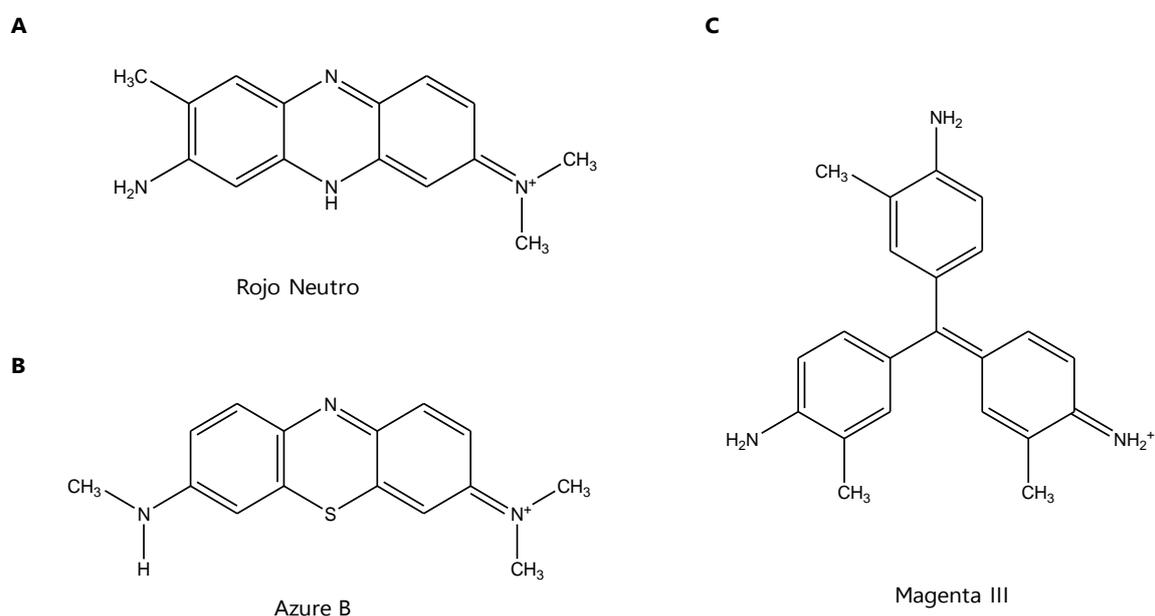
A diferencia de los fármacos convencionales, el concepto de selectividad en los tratamientos fotodinámicos se refiere, principalmente, a la acumulación preferencial del Fs entre células humanas sanas y a tratar, sin disponer de un sitio de unión subcelular específico. La captación selectiva del fármaco es crucial para la TFD y TFDA debido a que las ERO tienen una vida media corta y actúan específicamente en zonas próximas al sitio de producción.<sup>5</sup> Estudios previos han demostrado que la localización del agente terapéutico en mitocondrias, lisosomas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y membranas plasmáticas produce un efectivo daño tumoral.<sup>6-8</sup> Por otra parte, en la TFDA se evidenció que la excitación del Fs puede inducir daños en la pared celular, la membrana citoplasmática, ribosomas y ácido nucleico de los microorganismos, induciendo su muerte.<sup>5</sup> Las características estructurales más relevantes que pueden afectar la acumulación selectiva de los agentes fotosensibilizantes son: la carga iónica neta, el grado de hidrofobicidad y la asimetría molecular. Particularmente, los Fs catiónicos presentan alta selectividad por las células cancerígenas y bacterianas debido a la diferencia en los potenciales y componentes de las membranas de las células huéspedes y patológicas (Sección 3.1.2.2., Capítulo 1).<sup>9,10</sup>

Los Fs utilizados en aplicaciones biológicas deben absorber luz en la ventana fototerapéutica (600 – 800 nm), a fin de evitar la interacción de la irradiación con las moléculas endógenas y garantizar la activación del agente terapéutico. Las estrategias que han demostrado un incremento considerable en la  $\lambda_{\max}$  de estos compuestos son la inclusión de átomos pesados y grupos aromáticos en la estructura base de los Fs.<sup>5,11,12</sup> Además, modificaciones en cadenas laterales del cromóforo han sido evaluadas y, aunque presentan menor desplazamiento batocrómico que las derivatizaciones anteriores, son utilizadas en el diseño de nuevos compuestos fotodinámicos.<sup>5</sup>

Con el objetivo de incrementar la reactividad fotoquímica de los Fs, se propusieron diferentes modificaciones estructurales que estabilizan el  $^3\text{Fs}^*$ . La inclusión de átomos con un alto número atómico favorece el cruce entre sistemas de los estados excitados del Fs, debido a las grandes constantes de acoplamiento spin-orbital, lo que se denomina "efecto del átomo pesado". La sustitución periférica por bromo o yodo en el cromóforo o la inclusión de azufre o selenio como heteroátomos en los anillos de diferentes compuestos tricíclicos como tiazinas, azinas y oxazinas, entre otros, es práctica habitual en la potenciación de la producción de  $^1\text{O}_2$  y otras ERO.<sup>5,13,14</sup>

### 1.1. SELECCIÓN DE PROTOTIPOS

Diferentes Fs catiónicos no porfirínicos se consideraron como prototipos para el desarrollo de nuevos agentes fotodinámicos de segunda generación. Derivados de las familias de las azinas, tiazinas y triarilmetanos (**Figura 1**) se seleccionaron como precursores en base a sus propiedades fisicoquímicas, fotofísicas, fotoquímicas y los antecedentes en tratamientos fotodinámicos.



**Figura 1:** Estructura de los Fs seleccionados como prototipos. Familia de las azinas (**A**), tiazinas (**B**) y triarilmetanos (**C**).

- *Rojo Neutro* (RN, **Figura 1A**) es un compuesto perteneciente a la familia de las azinas que presenta numerosas aplicaciones biológicas como consecuencia de sus propiedades fisicoquímicas y naturaleza relativamente no tóxica. Cabe señalar su

aplicación en citometría, como sonda en sistemas biológicos y marcador lisosomal, debido a sus propiedades de base débil.<sup>15,16</sup> Este compuesto demostró ser un buen Fs en TFDA actuando mediante el mecanismo fotodinámico Tipo I (Sección 2 Capítulo 1), a través de la interacción con distintos sustratos intracelulares.<sup>17</sup> Además, estudios previos han demostrado que RN presenta alentadoras propiedades fotoantibacterianas y fotovirucidas. El tratamiento fotodinámico con este Fs, inactivó eficientemente diferentes cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.<sup>18,19</sup> Por otra parte, la erradicación completa del virus del Herpes Simple Tipo 1, se logró luego de la aplicación de RN e irradiación a 470 nm. Los primeros estudios fotodinámicos desarrollados con este Fs se publicaron en la década del '70, evidenciando prometedores resultados en el tratamiento de herpes genital e incluso en la terapia de infecciones recurrentes por este virus.<sup>20,21</sup>

- *Azure B* (AzB, **Figura 1B**) es un representante de la familia de la tiazinas. Estos compuestos son ampliamente investigados como agentes fototerapéuticos debido a sus propiedades biológicas, químicas, fotoquímicas y fotofísicas. Los Fs tiazínicos presentan máximos de absorción entre 620-660 nm (rango incluido en la ventana fototerapéutica), elevados  $\phi_{\Delta}$ , selectividad hacia las células cancerosas *in vivo*, afinidad por la membrana plasmática de levaduras y fototoxicidad frente a un amplio espectro bacteriano.<sup>22-27</sup> Los compuestos líderes de esta familia de Fs son AM y AT (Figura 7, Capítulo 1), los cuales presentan prometedores antecedentes relativos a sus aplicaciones fotodinámicas frente a *S. aureus*, *E. coli*, *Candida spp*, patógenos tropicales, virus y numerosas patologías oncológicas.<sup>24,28</sup> Por otra parte, el candidato seleccionado como prototipo para el desarrollo de esta Tesis Doctoral demostró importante fototoxicidad en *S. aureus*, *Candida albicans*, *Streptococcus sanguis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, esporas de *Bacillus cereus* y el virus de la estomatitis vesicular, entre otros microorganismos.<sup>14,26,29-32</sup> Estos antecedentes, sustentan a AzB como un excelente candidato para la derivatización en búsqueda de nuevos Fs de segunda generación.

- *Magenta III* (MG<sup>III</sup>, **Figura 1C**), también conocido como *New Fuchsin*, pertenece a la familia de los triarilmetanos. Estos compuestos evidencian una fuerte absorción en la región roja del espectro visible y tienen la capacidad de atravesar la pared celular de microorganismos *Gram*-positivos y *Gram*-negativos, por lo que han sido ampliamente estudiados en la aplicación de la TFDA.<sup>33,34</sup> Cristal Violeta (CV) y Verde de Malaquita son los líderes de esta familia de Fs y presentan antecedentes en la inactivación de numerosas bacterias, virus, hongos y parásitos, entre los que se destacan *S. aureus*, *E.*

*coli*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *C. albicans* y *Trypanosoma cruzi*.<sup>33,35-37</sup> Asimismo, MG<sup>III</sup> y sus derivados bromados exhiben antecedentes en el tratamiento fotodinámico de *C. albicans* y células de adenocarcinoma mamario murino (LM-2), y también presentan numerosos estudios relativos a sus propiedades fotoquímicas y fotofísicas.<sup>14,38</sup>

## 1.2. ESTRATEGIAS DE SÍNTESIS

Con la finalidad de optimizar las propiedades de los prototipos se proponen dos posibles derivatizaciones:

- *Formación de azo-compuestos:* desarrollando reacciones de diazotación y copulación se pueden incluir diferentes derivados aromáticos a la estructura de Fs con aminas aromáticas primarias. Mediante estas síntesis se expande la nube de electrones  $\Pi$  del agente fotosensibilizante y consecuentemente se incrementa la  $\lambda_{\max}$ .<sup>39,40</sup>

La reacción de diazotación se desarrolla entre una amina aromática primaria y nitrito de sodio, en presencia de un ácido mineral, para formar una sal de diazonio. Estos compuestos se descomponen con facilidad. Generalmente, las reacciones de diazotación son exotérmicas y el derivado formado es inestable, razón por la cual debe enfriarse el sistema (-5 a 0 °C) a fin de proteger el producto de síntesis. Las sales de diazonio actúan como electrófilos débiles en las reacciones electrofílicas aromáticas con diferentes anillos activados, para dar origen a los azo-compuestos, reacción que se denomina copulación.<sup>41,42</sup>

- *Yodación:* la halogenación es una estrategia ampliamente aplicada para optimizar las propiedades de los Fs utilizados en la actualidad. La inclusión de átomos pesados en la estructura molecular aumenta el acoplamiento de spin-orbital entre los estados singlete y triplete excitados del Fs, lo que conduce a un cruce entre sistemas más eficiente, potenciando la producción de  $^1\text{O}_2$  (Figura 3, Capítulo 1).<sup>43,44</sup> Este fenómeno se denomina "efecto del átomo pesado" y es proporcional al número atómico del sustituyente.<sup>45</sup>

Numerosos trabajos disponibles en bibliografía evalúan el efecto ocasionado por la halogenación sobre el rendimiento cuántico de formación de ERO correspondiente a diferentes Fs. Está demostrado que la bromación incrementa la producción de  $^1\text{O}_2$  de los agentes fototerapéuticos AzB y RN.<sup>14,18</sup> Además, la sustitución periférica por átomos de bromo o yodo en el cromóforo del derivado O-metílico de Violeta de metileno y *Nile*

*blue*, derivó en un aumento significativo de la reactividad fotoquímica de estos Fs. Es importante destacar que este incremento fue mayor para los derivados yodados.<sup>5,44,46</sup>

## 2. FORMACIÓN DE AZO-COMPUESTOS DE ROJO NEUTRO

### 2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

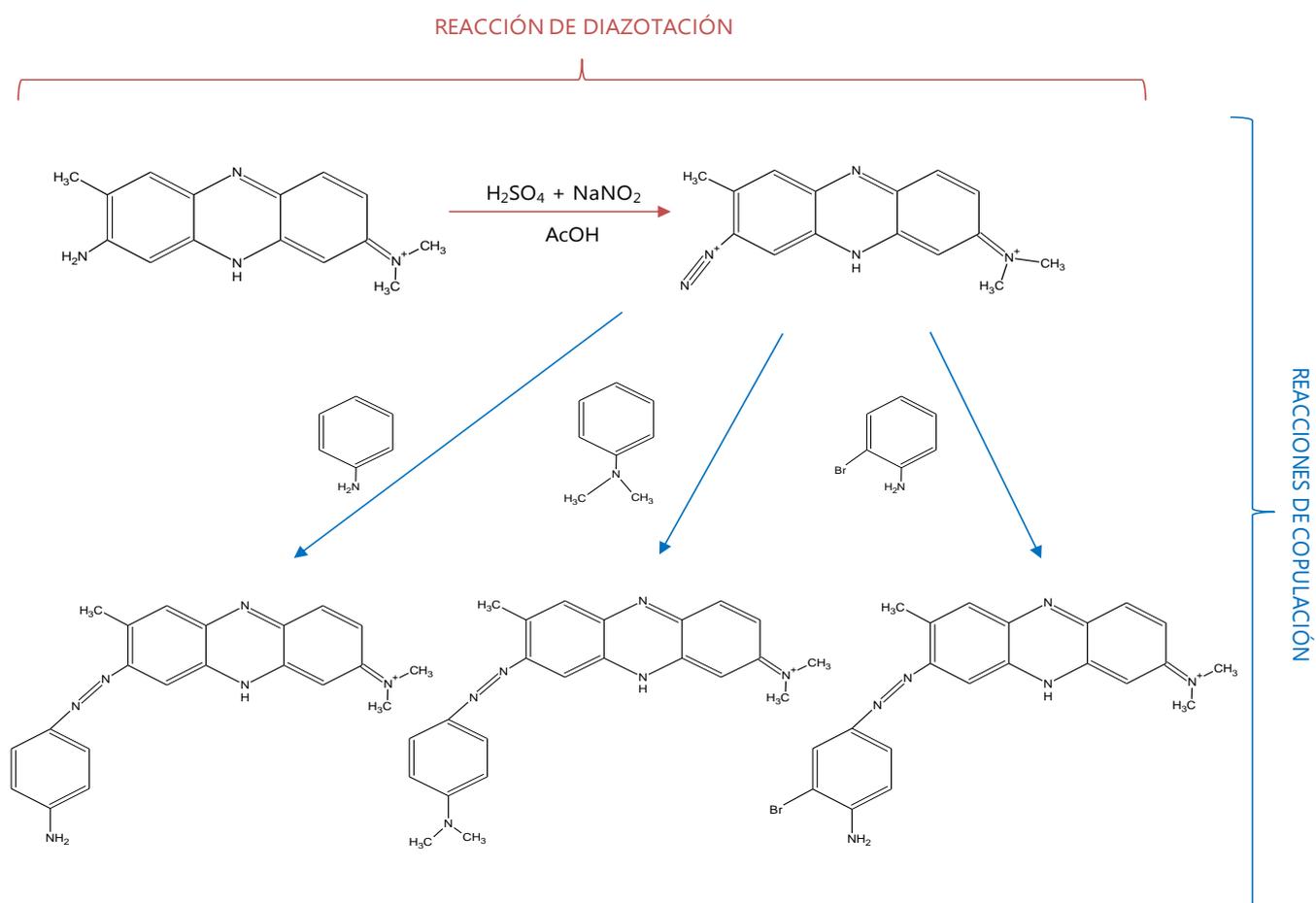
Las reacciones de diazotación y copulación se realizaron mediante una metodología convencional.<sup>39</sup> El agente nitrosante se preparó previamente a la formación de la sal de diazonio a partir de ácido sulfúrico (1 mL) y nitrito de sodio (0,0917 g). Esta combinación de reactivos se calentó a 65°C hasta la disolución completa de la sal y posteriormente se enfrió en un baño de hielo-cloruro de sodio y se dejó reaccionar durante 10 min. Cuidadosamente, el agente nitrosante (20 µL) se añadió a una solución de RN en AcOH (3 mg/ 3 mL) bajo agitación magnética constante y protegida de la luz. Transcurridos 10 min, se procedió a la reacción de copulación, agregando el producto de la diazotación a una solución acuosa de anilina, NN-dimetilanilina o 2-bromoanilina (compuestos aromáticos activados para la copulación) en una relación molar 1:1 con RN. Ambas etapas de síntesis se desarrollaron a temperatura controlada, sumergiendo el balón de reacción en un baño de hielo, a fin de evitar la degradación de la sal de diazonio correspondiente al Fs. La **Figura 2** representa el esquema general de síntesis aplicado. El producto de reacción se extrajo empleando diclorometano, el cual posteriormente se evaporó a presión reducida, en un evaporador rotatorio Büchi Rotavapor R-114, equipado con un baño termostatzado Büchi B-480.

Con la finalidad de determinar las condiciones óptimas de síntesis, diferentes tiempos de reacción se evaluaron aplicando la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC, siglas en inglés), empleando un cromatógrafo Agilent 1100 Series (Agilent Technologies). Este equipo dispone de una bomba isocrática, inyector automático, compartimiento termostatzado para columnas y detector espectrofotométrico UV-Visible de longitud de onda variable. Las determinaciones se realizaron en una columna C<sub>18</sub> Supelco® de fase reversa (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) con guarda columna, utilizando como fase móvil una mezcla de metanol (MeOH): solución acuosa de fosfato de trietilamina 83 mM (TEAP, siglas en inglés; 70:30 v/v), a una velocidad de flujo de 1,0 mL/min.

Los productos de reacción se analizaron por espectrometría de masas de alta resolución. Los registros se realizaron 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 evaluaron a una concentración 10 µg/mL en MeOH calidad HPLC.

El Fs, RN (Colour Index N° 50040, lote N° 017K1193) se adquirió en Sigma-Aldrich y se utilizó sin purificación adicional, confirmando por HPLC una pureza >98%. Los solventes y reactivos utilizados en la síntesis fueron de grado pro-análisis (Cicarelli, Sintorgan o Anedra) y las soluciones acuosas se prepararon en agua ultrapura, obtenida del sistema de purificación de agua Milli-Q® (Millipore Corporation).

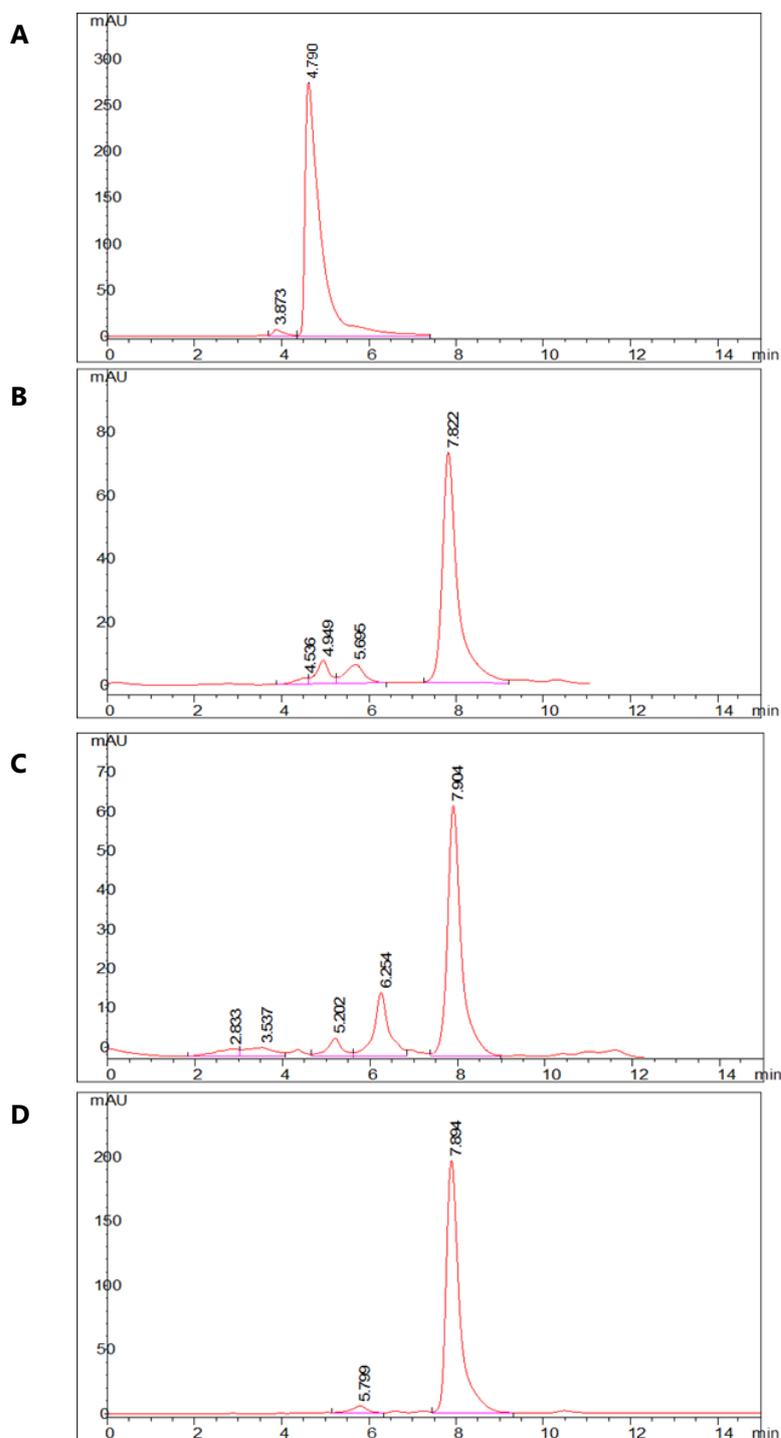


**Figura 2:** Reacciones de diazotación y copulación involucradas en la formación de azo-compuestos de RN.

## 2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cromatogramas obtenidos durante la evaluación de las condiciones óptimas para la formación de los azo-compuestos de RN, mostraron que los productos de síntesis no variaron en función del tiempo de copulación. Además, la comparación de los resultados

obtenidos de las derivatizaciones realizadas empleando anilina, NN-dimetilanilina y 2-bromoanilina, evidenciaron perfiles cromatográficos similares, presentando un pico mayoritario a un tiempo de retención ( $t_R$ ) de  $7,87 \pm 0,04$  min determinado para un  $n=6$ . Cabe destacar que el  $t_R$  de estos derivados difiere significativamente del reactivo de partida (RN), el cual presenta un  $t_R$  de  $4,72 \pm 0,07$  min<sup>47</sup> (**Figura 3**).

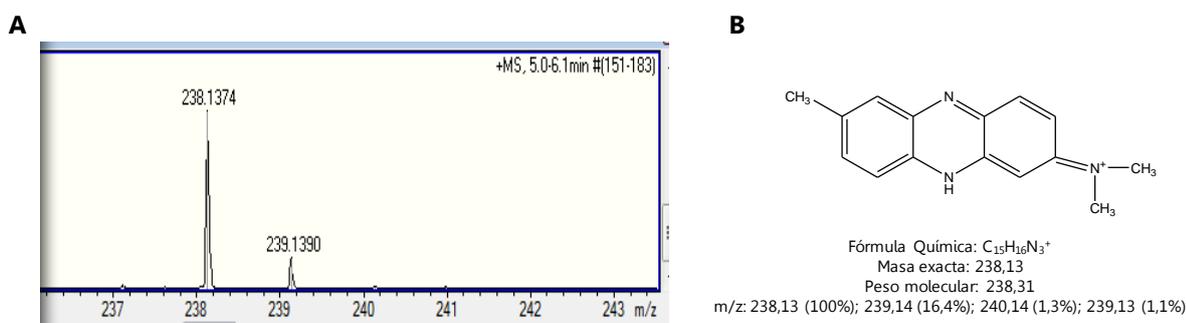


**Figura 3:** Cromatogramas: (A) RN y de los productos de reacción obtenidos mediante la copulación con (B) anilina, (C) NN-dimetilanilina y (D) 2-bromoanilina.

Los resultados obtenidos permitieron inferir que:

- La sal de diazonio de NR es inestable y se descompone rápidamente, aún en condiciones experimentales que intentan evitar este proceso.
- Las reacciones de copulación no tienen lugar en las condiciones experimentales ensayadas.

A fin de corroborar las hipótesis propuestas, se analizó por espectrometría de masas de alta resolución el producto de síntesis obtenido de la copulación con bromoanilina, siendo este derivado el que presentó mayor grado de pureza. El espectro obtenido se muestra en la **Figura 4A** y corresponde al derivado desaminado de RN, compuesto generado por pérdida del grupo diazonio de la sal formada (**Figura 4B**). El espectro de masas evidencia dos señales con relación masa/carga ( $m/z$ , en inglés) de 338,1374 y 239,1390, que se corresponden con los valores calculados para el producto de degradación propuesto. Cabe destacar que la pérdida del grupo diazonio, mediante la liberación de nitrógeno gaseoso, es el principal producto de degradación correspondiente al intermediario involucrado en la formación de azo-compuestos. Esta reacción de descomposición no pudo frenarse mediante el descenso de la temperatura, durante el desarrollo de los procesos sintéticos.



**Figura 4: A-** Espectro de masas obtenido para el producto de la copulación con bromoanilina.

**B-**Estructura química y relaciones  $m/z$  calculadas para el derivado desaminado de NR.

Podemos concluir que debido a la inestabilidad que presenta la sal de diazonio de NR, se obtuvo como producto mayoritario de la reacción de diazotación, el derivado desaminado de este compuesto. En consecuencia, no fue viable la formación de los azo-compuestos propuestos para el desarrollo de nuevos Fs de segunda generación.

### 3. YODACIÓN DE MAGENTA III Y AZURE B

#### 3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó un método de yodación previamente descrito, que se caracteriza por su sencillez y elevado rendimiento.<sup>48</sup> El mismo, involucra la formación del agente yodante *in situ* a partir de yoduro de potasio, peryodato de sodio y cloruro de sodio en una relación molar 1:1:2, utilizando como medio de reacción una mezcla AcOH: agua (9:1 v/v). Todos los reactivos, incluidos los Fs, se disolvieron individualmente en este medio y se mezclaron cuidadosamente bajo agitación magnética constante y protección de la luz. Es importante destacar que el yoduro de potasio debe incorporarse con un goteo lento para dar inicio a la reacción. La síntesis se detuvo mediante evaporación a 60°C y presión reducida, empleando un evaporador rotatorio Büchi Rotavapor R-114, equipado con un baño termostatzado Büchi B-480. Las sales inorgánicas generadas como subproductos de síntesis se eliminaron mediante la resuspensión en diclorometano y posterior filtración del crudo de reacción utilizando una membrana Millipore con poros de 0,45 µm. Finalmente, el solvente orgánico se eliminó por evaporación a presión reducida.

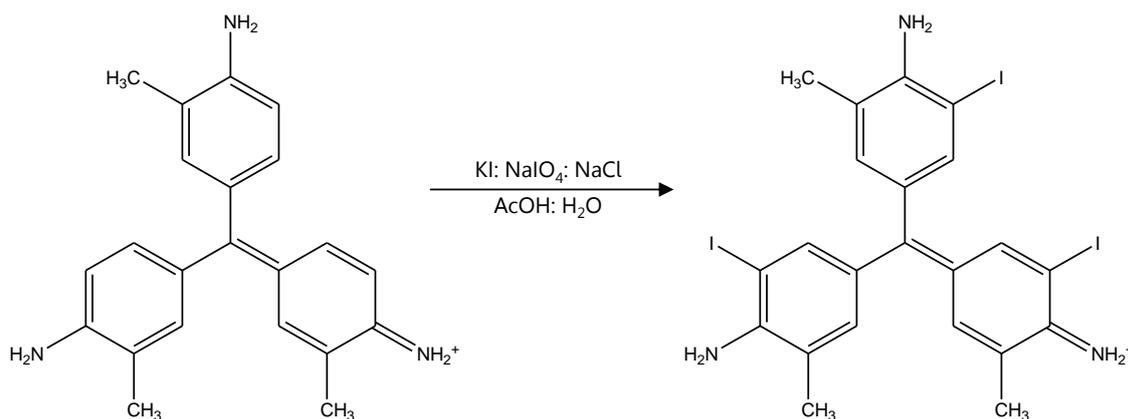
En base a los resultados obtenidos en trabajos de investigación previos a esta Tesis Doctoral, relativo a las bromaciones de MG<sup>III</sup> y AzB,<sup>38</sup> se propuso como objetivo inicial, la preparación del derivado tri-yodado del Fs perteneciente a la familia de los triarilmetanos (MG<sup>III</sup>I<sub>3</sub>) y mono-yodado del compuesto tiazínico (AzBI). La relación Fs: reactantes, temperatura y tiempo de reacción se evaluaron por HPLC (Agilent 1100 Series; especificaciones Sección 2.1.) y cromatografía en capa delgada (TLC, siglas en inglés) a fin de seleccionar las condiciones óptimas que permitieran obtener los derivados propuestos. Los productos obtenidos se analizaron por espectrofotometría UV-visible (Evolution 300, con celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico) y se caracterizaron por espectrometría de masas de alta resolución (Bruker Micro QTOF II, especificaciones Sección 2.1.).

##### 3.1.1. DERIVATIZACIÓN DE MAGENTA III

La muestra comercial de MG<sup>III</sup> (Colour Index N°42520, lote N° 043k3403), provista por Sigma-Aldrich, consiste en una mezcla ternaria de Magenta I, Magenta II y el correspondiente MG<sup>III</sup>. Estos compuestos difieren estructuralmente en el número de sustituyentes metilo, en la posición orto a los grupos amino aromáticos. Por este motivo, fue necesaria la purificación previa a la derivatización del Fs, mediante cromatografía en

columna utilizando la metodología descrita por Montes de Oca y colaboradores.<sup>49</sup> La reacción planteada para la obtención de MG<sup>III</sup>I<sub>3</sub> se esquematiza en la **Figura 5**.

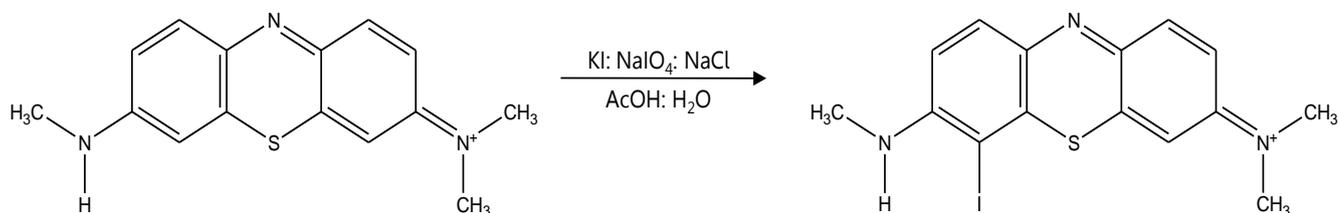
Las fases móviles empleadas para el análisis del reactivo de partida y de los productos de síntesis por HPLC y TLC fueron MeOH: TEAP (70:30 v/v) y diclorometano: etanol (EtOH) (4: 1 v/v) respectivamente. La relación de frentes ( $R_f$ ) y el  $t_R$  de cada compuesto se determinó para 6 mediciones.



**Figura 5:** Reacción de yodación de MG<sup>III</sup>

### 3.1.2. DERIVATIZACIÓN DE AZURE B

La muestra comercial de AzB (Colour Index N°52010, lote N° 014k3720) adquirida en Sigma-Aldrich se utilizó sin purificación adicional. Las mezclas de acetonitrilo: TEAP (60:40 v/v) y N-butanol: agua: AcOH (4: 1: 5 v/v) se emplearon como fases móviles para realizar el seguimiento de las reacciones químicas mediante HPLC y TLC, respectivamente. La reacción planteada para la obtención de AzBI se esquematiza en la **Figura 6**.



**Figura 6:** Reacción de yodación de AzB.

Diferentes metodologías de purificación se implementaron con la finalidad de separar los productos obtenidos. A continuación se detallan los procedimientos aplicados:

- Precipitación por disminución de la temperatura y cambio de pH: el producto de síntesis fue redissuelto completamente con ayuda de sonicación en agua ultrapura obtenida del sistema de purificación de agua Milli-Q® (Millipore Corporation). Posteriormente, la solución se sumergió en un baño de hielo y cloruro de sodio durante 30 min. Ante la ausencia de precipitado se agregó hidróxido de sodio a fin de favorecer la formación de la especie neutra de la tiazina y consecuentemente su precipitación.
- Diferencia de solubilidad de los productos de síntesis: con la finalidad de favorecer la solubilidad de las impurezas y la precipitación del derivado yodado, se agregó una solución fría de hidróxido de sodio (pH 13) al crudo de reacción evaporado y posteriormente se agitó 15 min a 1500 rpm.
- Cromatografía en columna: la purificación se desarrolló en una columna de vidrio de 45,7 x 1,5 cm empleando sílica gel (Sigma-Aldrich) de 70-230 mesh con un diámetro de poro de 60Å. Se utilizaron diferentes proporciones de diclorometano: isopropanol: EtOH como eluyentes para la separación de los productos.
- Cromatografía en placa delgada preparativa: se emplearon placas de sílica gel 60 con soporte de vidrio de 10 x 20 cm. Se utilizó como fase móvil una mezcla de N-butanol: agua: AcOH (4: 1: 5 v/v).

## 3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.2.1 YODACIÓN DE MAGENTA III

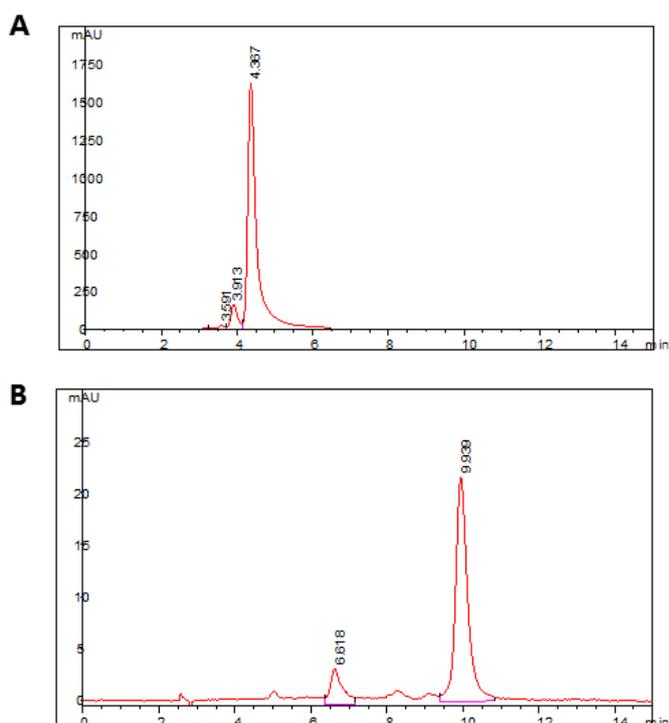
Inicialmente se planteó como objetivo la obtención del derivado  $MG^{III}I_3$  pero las condiciones de síntesis evaluadas permitieron obtener, como único producto el Fs di-yodado ( $MG^{III}I_2$ ). La **Tabla 1** resume los resultados obtenidos en el estudio sistemático de las condiciones de síntesis, analizando el crudo de reacción mediante HPLC.

Las reacciones 3, 6, 8 y 9 permitieron obtener al derivado di-yodado con elevado grado de pureza. Por otra parte, el incremento de las proporciones de reactivos ( $KI:NaIO_4:NaCl$ ) en relación a  $MG^{III}$  permitió disminuir el tiempo de reacción (condiciones 2, 5 y 8). Así mismo, potenció la formación de sales inorgánicas. La difícil eliminación de estos subproductos (resuspensión y filtración) condujo a la selección de la reacción 3 como condiciones óptimas de síntesis de  $MG^{III}I_2$ , con un rendimiento del producto crudo del 89%.

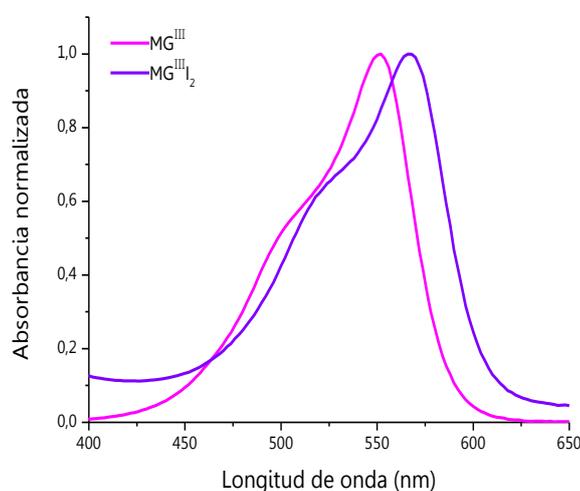
**Tabla 1:** Evaluación de las condiciones de reacción para la yodación de MG<sup>III</sup>.

Reacción	MG <sup>III</sup> :KI:NaIO <sub>4</sub> :NaCl	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	MG <sup>III</sup> I <sub>2</sub> (%)
1		25	24	27
2	1:3:3:6	35	24	34
3		35	31	89
4		35	48	73
5			24	83
6	1:4:4:8	35	31	93
7			48	77
8			24	90
9	1:6:6:12	35	31	94
10			48	66

El reactivo de partida y el nuevo producto de síntesis se analizaron por HPLC y TLC. En la **Figura 7** se pueden observar los cromatogramas correspondientes a MG<sup>III</sup> y MG<sup>III</sup>I<sub>2</sub> con  $t_R$  de  $4,01 \pm 0,03$  min y  $9,85 \pm 0,08$  min, respectivamente. Por otra parte, estos compuestos se evaluaron e identificaron por TLC, evidenciando valores de  $R_f$  de  $0,56 \pm 0,02$  y  $0,67 \pm 0,03$  para el Fs comercial y su derivado di-yodado.

**Figura 7:** Cromatogramas obtenidos para MG<sup>III</sup> (A) y MG<sup>III</sup>I<sub>2</sub> (B).

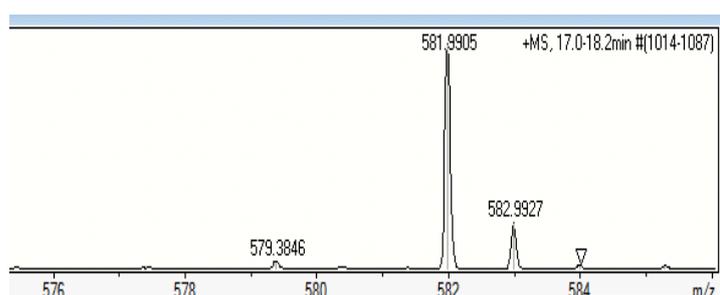
Con el objetivo de evaluar el corrimiento batocrómico ocasionado por la sustitución con átomos de halógeno, se analizaron las curvas espectrales correspondientes a los compuestos triarilmetanos estudiados (**Figura 8**). Se puede observar que, en el medio evaluado, el nuevo derivado yodado presentó un máximo de absorción a 566 nm, incrementando en 14 nm la  $\lambda_{\text{max}}$  con relación al atribuido a de  $\text{MG}^{\text{III}}$ . Es importante destacar que se evidenció una significativa decoloración de las soluciones de  $\text{MG}^{\text{III}}\text{I}_2$ . Este fenómeno ha sido descrito para numerosos compuestos de la familia de los triarilmetanos y es indicativo de la formación de la especie carbinol, la cual disminuye la eficacia fotodinámica del Fs.<sup>14</sup>



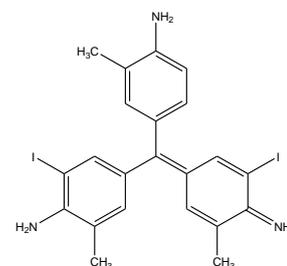
**Figura 8:** Espectros de absorción de  $\text{MG}^{\text{III}}$  y  $\text{MG}^{\text{III}}\text{I}_2$  en MeOH:TEAP (70:30 v/v).

Finalmente, el producto de síntesis se caracterizó mediante espectrometría de masas de alta resolución. El espectro obtenido evidenció un perfil comparable al calculado para  $\text{MG}^{\text{III}}\text{I}_2$ , presentando una señal principal a relación  $m/z = 581,9905$  (**Figura 9**).

**A**



**B**



Fórmula Química:  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{I}_2\text{N}_3^+$   
 Masa exacta: 581,99  
 Peso molecular: 582,24  
 $m/z$ : 581,99 (100%); 582,99 (23,8%); 584,00 (2,7%)

**Figura 9:** Espectro de masas obtenido para el producto de síntesis (**A**) y datos calculados para  $\text{MG}^{\text{III}}\text{I}_2$  (**B**).

Es posible concluir que, mediante el estudio sistemático de las condiciones de yodación de  $\text{MG}^{\text{III}}$ , se sintetizó el derivado di-yodado con un elevado grado de pureza (89%).  $\text{MG}^{\text{III}}\text{I}_2$  se identificó por HPLC y TLC, y se caracterizó por espectrometría de masas de alta resolución. La sustitución por halógeno, incrementó la  $\lambda_{\text{max}}$  del compuesto perteneciente a la familia de los triarilmetanos, potenciando sus propiedades como posible Fs. Del mismo modo, esta derivatización favoreció la forma carbinol, produciendo una rápida decoloración del Fs en solución de MeOH: TEAP (70:30 v/v).

### 3.2.2 YODACIÓN DE AZURE B

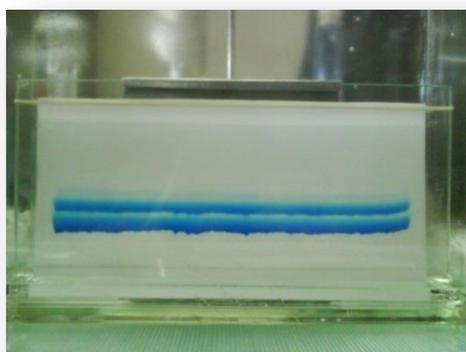
El derivado AzBI ha sido reportado en literatura como un producto secundario de la yodación de AM, sin detallar condiciones óptimas de síntesis ni estudios relativos a las propiedades fisicoquímicas, fotofísicas y fotoquímicas del mismo. Enfocados en la evaluación de AzBI como Fs para su posible aplicación en TFD y TFDA, se analizaron diferentes parámetros involucrados en la reacción de yodación de AzB con el objetivo de seleccionar las condiciones óptimas para la derivatización (**Tabla 2**).

**Tabla 2:** Evaluación de las condiciones de reacción para la yodación de AzB.

Reacción	AzB:KI:NaIO <sub>4</sub> :NaCl	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	AzBI (%)
1	1:1.1:2	25	69	15,9
2		40		37,5
3		60		13,9
4	1:2:2:4	40		47,3
5	1:3:3:6			56,0
6	1:4:4:8			41,4
7			48	51,2
8		46	63,2	

Se consideró en la evaluación un exceso de reactantes, elevadas temperaturas y distintos tiempos de reacción, obteniendo en todos los casos sólo el derivado mono-yodado con un rendimiento máximo del 63% (reacción 8), con la formación de un subproducto. Frente al desafío de purificar el derivado AzBI, se evaluaron diversas alternativas metodológicas. Aplicando las diferencias de solubilidad y precipitación se obtuvo el derivado mono-yodado con una pureza máxima del 80%. Por otra parte, las

cromatografías en columna y placa preparativa, permitieron incrementar la pureza, alcanzando un 95% con ambas técnicas cromatográficas. Es importante destacar que el segundo procedimiento cromatográfico fue más eficaz y rápido, por lo que se seleccionó como alternativa metodológica apropiada para la purificación de AzBI (**Figura 10**).



**Figura 10:** Cromatografía en placa preparativa para la purificación del crudo de reacción de la yodación de AzB.

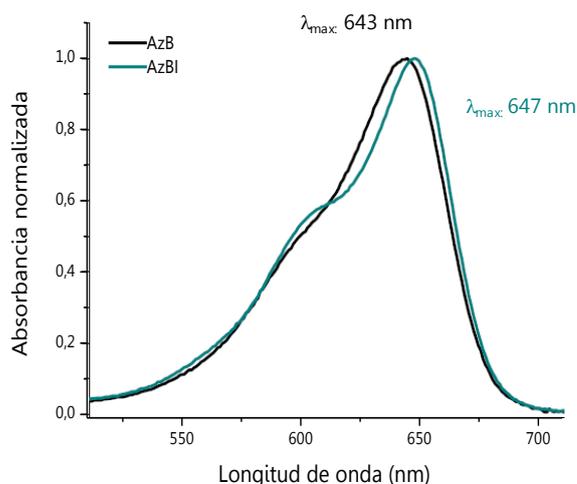
El reactivo de partida, el crudo de reacción y el producto purificado fueron evaluados por HPLC y TLC. Los valores de  $R_f$  y  $t_R$  se muestran en la **Tabla 3**.

**Tabla 3:** Identificación por HPLC y TLC de AzB y de los productos de yodación.

Compuesto	$t_R$ (min)	$R_f$
AzB	$4,13 \pm 0,02$	$0,32 \pm 0,01$
AzBI	$5,36 \pm 0,05$	$0,42 \pm 0,01$
Subproducto	$4,56 \pm 0,02$	$0,39 \pm 0,01$

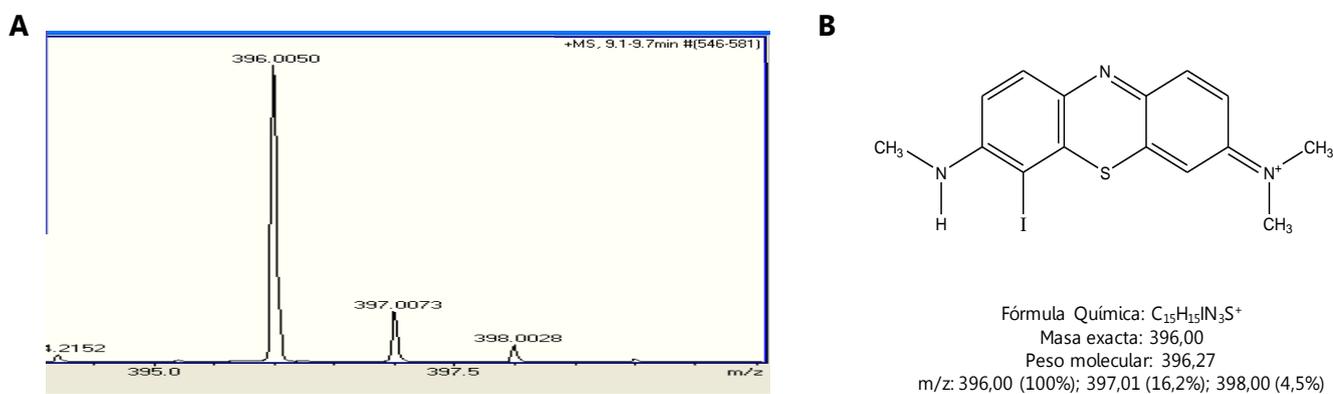
Calculados para  $n = 5$

El análisis espectrofotométrico de los compuestos AzB y AzBI, puso de manifiesto el corrimiento batocrómico ocasionado por la halogenación (**Figura 11**). El nuevo derivado presentó un máximo de absorción a 647nm en el medio evaluado, con un incremento de 4 nm en la  $\lambda_{max}$  respecto al precursor.



**Figura 11:** Curvas espectrales de AzB y AzBI en acetonitrilo: TEAP (60:40 v/v)

Finalmente, se aplicó la espectrometría de masas de alta resolución a fin de caracterizar el producto mono-yodado. En la **Figura 12**, se observa el espectro correspondiente a la muestra analizada y los datos calculados para AzBI, los cuales presentaron señales a relaciones  $m/z$  comparables.

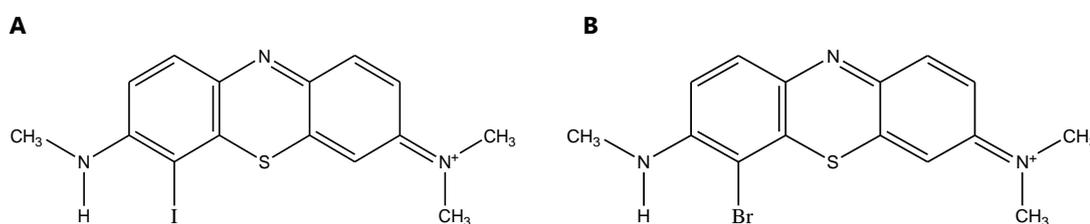


**Figura 12:** Espectro de masas correspondientes al producto de síntesis (**A**) y datos calculados para AzBI (**B**).

En resumen, el derivado mono-yodado del Fs tiazínico se obtuvo con un 95% de pureza, aplicando la cromatografía en placa preparativa para su purificación. Este compuesto se caracterizó por espectrometría de masas de alta resolución y se identificó por HPLC y TLC. El estudio espectrofotométrico demostró que la yodación produjo un corrimiento batocrómico de la  $\lambda_{\max}$  del Fs.

#### 4. SELECCIÓN DEL FOTOSENSIBILIZADOR LIDER

Considerando que los compuestos pertenecientes a la familia de los triarilmetanos, tienden a formar carbinol en solución, lo cual disminuye drásticamente la reactividad fotoquímica de estos Fs, se seleccionó a los derivados tiazínicos con el objetivo de determinar el candidato que presente mejor perfil para su aplicación fotodinámica. En esta instancia se realizó una comparación de las propiedades del compuesto AzBI y del derivado monobromado de AzB (AzBBr, **Figura 13**), sintetizado en el marco de otra Tesis Doctoral.<sup>38</sup> Teniendo como sustento las características que debe presentar un Fs ideal (Sección 3.1., Capítulo 1), se analizaron las condiciones óptimas de síntesis, la  $\lambda_{\max}$  y el  $\phi_{\Delta}$  de ambos derivados.



**Figura 13:** Estructura química de AzBI (**A**) y AzBBr (**B**).

##### 4.1. MATERIALES Y MÉTODOS

Las condiciones óptimas de síntesis del derivado yodado y bromado de AzB se detallan en la Sección 3.2.2. del presente Capítulo y en el trabajo publicado por Montes de Oca, respectivamente.<sup>38</sup>

Por otra parte, el efecto batocrómico ocasionado por la halogenación del compuesto AzB se evaluó mediante el análisis de las curvas espectrales obtenidas en acetonitrilo: TEAP (60:40 v/v), correspondiente a la fase móvil utilizada en HPLC. Las determinaciones se realizaron entre 350 nm y 750 nm en un espectrofotómetro UV-visible Evolution 300 (Thermo Scientific), empleando una celda de cuarzo de 1cm de paso óptico.

Finalmente, el  $\phi_{\Delta}$  de AzBI se determinó aplicando la metodología descrita para la evaluación fotoquímica de AzB y AzBBr.<sup>14</sup> La cinética de descomposición de 9,10-dimetilantraceno (DMA), un atrapador químico del <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, se analizó por espectrofotometría UV-Visible (Shimadzu UV-2401PC) a fin de cuantificar de manera indirecta la producción de esta ERO. En este ensayo se evaluó la fotooxidación de una solución de DMA (35  $\mu$ M) y AzBI (absorbancia  $\sim$  0,3) en solución de N,N-dimetilformamida y el agregado de una

gota de AcOH, con irradiación de luz monocromática a 650 nm durante 420 s. La producción de  $^1\text{O}_2$  es abordada con mayor profundidad en los Capítulos 3 y 5 de esta Tesis Doctoral.

#### 4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla 4** se detallan las condiciones óptimas de síntesis de AzBBr y AzBI. El derivado monobromado requiere condiciones menos drásticas (menor concentración de reactante, temperatura y tiempo de reacción) que las aplicadas para la yodación. Por otra parte, el compuesto AzBBr es obtenido con un elevado grado de pureza, sin necesidad de aplicar un método de purificación adicional.

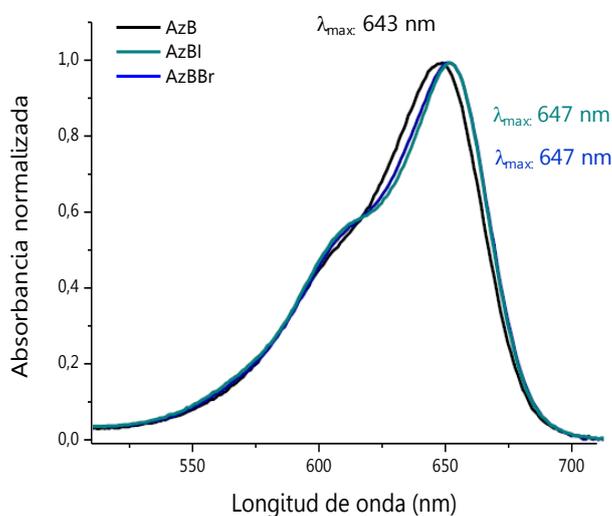
**Tabla 4:** Condiciones óptimas para la obtención de los derivados halogenados de AzB.

Fs	Reactivos	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Purificación	Pureza (%)
AzBI	AzB:KI:NaIO <sub>4</sub> :NaCl (1:4:4:8)	40	46	Cromatografía por placa preparativa	95
AzBBr	AzB:Br <sub>2</sub> (1:1)	25	1	-	95

No se observaron diferencias significativas en las propiedades fotofísicas y fotoquímicas que presentan los nuevos derivados como consecuencia de la sustitución por un átomo de halógeno diferente. La evaluación espectrofotométrica de los Fs tiazínicos evidenció que, tanto la yodación como la bromación, producen un corrimiento batocrómico de 4 nm con respecto al precursor AzB (**Figura 14**). Asimismo, los  $\phi_{\Delta}$  determinados para AzBI y AzBBr son similares (**Tabla 5**). Es importante señalar que las halogenación aumentó marcadamente la producción de  $^1\text{O}_2$  del prototipo AzB, triplicando el valor obtenido para el Fs comercial. Esta propiedad potencia el interés en la evaluación de estos compuestos como Fs aplicables a una gran variedad de tratamientos fotodinámicos. Cabe destacar que los valores de  $k_{\text{obs}}$  corresponden a la pendiente de los gráficos de fotodegradación de DMA.

En base a los resultados obtenidos se seleccionó el derivado monobromado con la finalidad de profundizar el estudio de las propiedades más relevantes que permitirán

predecir el comportamiento de este Fs en condiciones fisiológicas como así también, proponer estrategias de vehiculización para optimizar la eficacia fotodinámica



**Figura 14:** Espectros de absorción de los Fs tiazínicos.

**Tabla 5:** Determinación de los  $\phi_{\Delta}$  de los Fs tiazínicos.

Compuesto	$k_{\text{obs}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$\phi_{\Delta}$
AzB	$(4,61 \pm 0,07) \times 10^{-4}$	1
AzBBR	$(1,32 \pm 0,03) \times 10^{-3}$	2,9
AzBI	$(1,31 \pm 0,03) \times 10^{-3}$	2,8

## 5. CONCLUSIONES

Con el objetivo de desarrollar Fs de segunda generación se evaluaron diferentes parámetros involucrados en las reacciones de diazotación y copulación del compuesto RN como así también, la yodación de  $\text{MG}^{\text{III}}$  y AzB. Los productos obtenidos se identificaron por HPLC y TLC y se caracterizaron mediante espectrometría de masas de alta resolución.

La sal de diazonio del compuesto RN, presentó una significativa inestabilidad química que imposibilitó la obtención de los derivados azo correspondientes a este Fs. Por otra

parte, la reacción de halogenación permitió la obtención de  $\text{MG}^{\text{III}}\text{I}_2$  y AzBI. Es importante destacar que la yodación indujo un aumento en la  $\lambda_{\text{max}}$  de los Fs, potenciando las aplicaciones terapéuticas de estos compuestos. Las soluciones de  $\text{MG}^{\text{III}}\text{I}_2$  se decoloraron rápidamente como consecuencia de la formación del correspondiente carbinol, especie que disminuye su reactividad fotoquímica. Por ese motivo, se seleccionaron los derivados tiazínicos para continuar con el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Frente al desafío de seleccionar el Fs tiazínico líder y profundizar el estudio relativo a las propiedades de interés farmacéutico, se compararon las condiciones de síntesis, la  $\lambda_{\text{max}}$  y el  $\phi_{\Delta}$  de los derivados AzBI y AzBBr. Si bien ambos compuestos presentaron un máximo de absorción cercano a 650 nm, comprendido en la ventana fototerapéutica, y del mismo modo evidenciaron una importante producción de  $^1\text{O}_2$ , se seleccionó como líder el derivado monobromado de AzB, ya que se obtiene con alto grado pureza mediante una síntesis relativamente sencilla.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- 1 De Assis FF, De Souza JM, Assis BHK, Brocksom TJ, De Oliveira KT. Synthesis and photophysical studies of a chlorin sterically designed to prevent self-aggregation. *Dyes and Pigments* 2013; 98: 153–159.
- 2 Frei A, Rubbiani R, Tubafard S, Blacque O, Anstaett P, Felgenträger A et al. Synthesis, characterization, and biological evaluation of new RU(II) polypyridyl photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 57: 7280–7292.
- 3 Wainwright M, Meegan K, Loughran C. Phenothiazinium photosensitisers IX. Tetra- and pentacyclic derivatives as photoantimicrobial agents. *Dyes and Pigments* 2011; 91: 1–5.
- 4 Mazzone G, Quartarolo AD, Russo N. PDT-correlated photophysical properties of thienopyrrole BODIPY derivatives. Theoretical insights. *Dyes and Pigments* 2016; 130: 9–15.
- 5 Wainwright M, Mohr H, Walker WH. Phenothiazinium derivatives for pathogen inactivation in blood products. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2007; 86: 45–58.
- 6 Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2004; 1: 279–293.
- 7 Allison RR, Moghissi K. Oncologic photodynamic therapy: Clinical strategies that modulate mechanisms of action. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2013; 10: 331–341.
- 8 Robertson CA, Evans DH, Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2009; 96: 1–8.

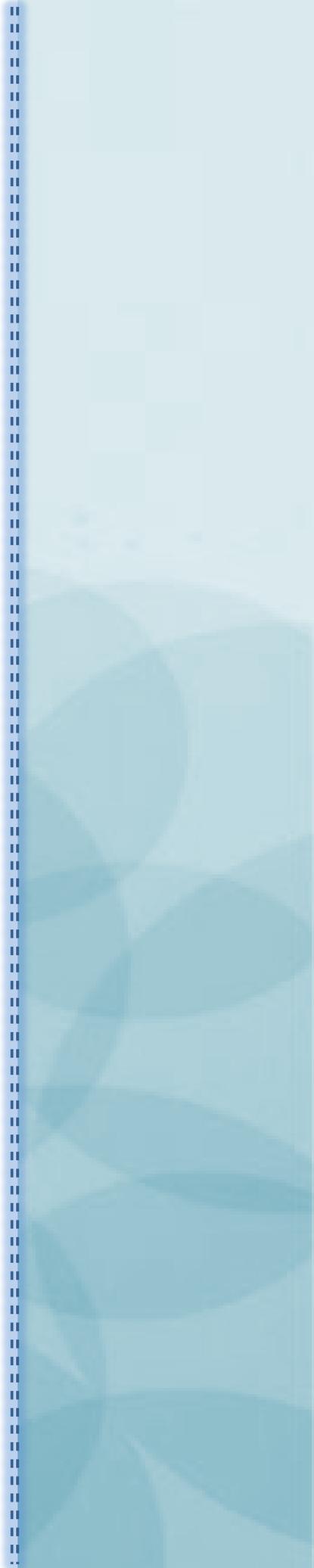
- 9 Kiesslich T, Gollmer A, Maisch T, Berneburg M, Plaetzer K. A comprehensive tutorial on in vitro characterization of new photosensitizers for photodynamic antitumor therapy and photodynamic inactivation of microorganisms. *BioMed Research International* 2013; Article ID 840417.
- 10 Yue C, Yang Y, Zhang C, Alfranca G, Cheng S, Ma L et al. ROS-Responsive mitochondria-targeting blended nanoparticles: Chemo- and photodynamic synergistic therapy for lung cancer with on-demand drug release upon Irradiation with a single light source. *Theranostics* 2016; 6: 2352–2366.
- 11 Gorman A, Killoran J, O`Shea C, Kenna T, Gallagher WM, O`Shea DF. In vitro demonstration of the heavy-atom effect for photodynamic therapy. *Journal of the American Chemical Society* 2004; 126: 10619–10631.
- 12 Shivashimpi GM, Pandey SS, Watanabe R, Fujikawa N, Ogomi Y, Yamaguchi Y et al. Effect of nature of anchoring groups on photosensitization behavior in unsymmetrical squaraine dyes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2014; 273: 1–7.
- 13 Wainwright M. Tricyclic cationic chromophores as models for new photoantimicrobials. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2015; 26: 2390–2404.
- 14 Alvarez MG, Montes de Oca MN, Milanesio ME, Ortiz CS, Durantini EN. Photodynamic properties and photoinactivation of *Candida albicans* mediated by brominated derivatives of triarylmethane and phenothiazinium dyes. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2014; 11: 148–155.
- 15 Basu S, Panigrahi S, Praharaj S, Ghosh SK, Pande S, Jana S et al. Solvent effect on the electronic spectra of azine dyes under alkaline condition. *Journal of Physical Chemistry A* 2007; 111: 578–583.
- 16 Dubrovsky JG, Guttenberger M, Saralegui A, Napsucialy-Mendivil S, Voigt B, Baluška F et al. Neutral red as a probe for confocal laser scanning microscopy studies of plant roots. *Annals of Botany* 2006; 97: 1127–1138.
- 17 Fischer BB, Krieger-Liszkay A, Eggen RIL. 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: 747–759.
- 18 Urrutia MN, Alovero FL, Ortiz CS. New azine compounds as photoantimicrobial agents against *Staphylococcus aureus*. *Dyes and Pigments* 2015; 116: 27–35.
- 19 Phoenix DA, Sayed Z, Hussain S, Harris F, Wainwright M. The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2003; 39: 17–22.
- 20 Cassidy CM, Tunney MM, McCarron PA, Donnelly RF. Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: From benchtop to clinical practice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2009; 95: 71–80.
- 21 Yen GS, Simon EH. Photosensitization of herpes simplex virus type 1 with neutral red. *The Journal of general virology* 1978; 41: 273–81.
- 22 Paul P, Suresh Kumar G. Spectroscopic studies on the binding interaction of phenothiazinium dyes toluidine blue O, azure A and azure B to DNA. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2013; 107: 303–310.

- 23 Ronzani F, Trivella A, Bordat P, Blanc S, Lacombe S. Revisiting the photophysics and photochemistry of methylene violet (MV). *Journal of Photochemistry and Photobiology A* 2014; 284: 8–17.
- 24 Moreira LM, Lyon JP, Tursi SMS, Trajano I, Felipe MP, Costa MS et al. Azure dyes as new photosensitizer prototypes to application in photodynamic therapy against *Candida spp.* *Spectroscopy* 2010; 24: 621–628.
- 25 Phoenix DA, Harris F. Phenothiazinium-based photosensitizers: Antibacterials of the future? *Trends in Molecular Medicine* 2003; 9: 283–285.
- 26 Wainwright M. Methylene blue derivatives - Suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? *International Journal of Antimicrobial Agents* 2000; 16: 381–394.
- 27 Wainwright M, Phoenix DA, Marland J, Wareing DRA, Bolton FJ. A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 1997; 19: 75–80.
- 28 Gollmer A, Felgenträger A, Bäumlner W, Maisch T, Späth A. A novel set of symmetric methylene blue derivatives exhibits effective bacteria photokilling - a structure-response study. *Photochemical & photobiological sciences* 2015; 14: 335–351.
- 29 Sanadi RM. Medical Science Photodynamic Therapy: An Overview. *International Journal of Scientific Research* 2013; : 271–272.
- 30 Sperandio FF, Huang Y-Y, Hamblin MR. Antimicrobial Photodynamic Therapy to Kill Gram-negative Bacteria. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2013; 8: 1–23.
- 31 Wainwright M, Phoenix DA, Laycock SL, Wareing DR, Wright P a. Photobactericidal Activity of Phenothiazinium Dyes Against Methicillin-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus*. *FEMS microbiology letters* 1998; 160: 177–181.
- 32 Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. *Current Microbiology* 1992; 25: 77–81.
- 33 Li K, Lei W, Jiang G, Hou Y, Zhang B, Zhou Q. Selective Photodynamic Inactivation of Bacterial Cells over Mammalian Cells by New Triarylmethanes. *Langmuir* 2014; 30: 14573–14580.
- 34 Pereira Rosa L, da Silva FC. Antimicrobial Photodynamic Therapy: A New Therapeutic Option to Combat Infections. *Journal of Medical Microbiology & Diagnosis* 2014; 3: 1–7.
- 35 Baptista MS, Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) for the treatment of malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2011; 44: 1–10.
- 36 Calabró G, Patalano A, Lo Conte V, Chianese C. Photodynamic chemotherapy in the treatment of superficial mycoses: an evidence-based evaluation. *Giornale Italiano Di Dermatologia e Venereologia* 2013; 148: 639–648.
- 37 Hasegawa GKF, Lopes de Morais J, Soares M, Freitas AM de. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by methylene blue and malachite green under red LED light doi: *Revista Ambiente e Agua* 2015; 10: 318–326.
- 38 Montes De Oca MN, Vara J, Milla L, Rivarola V, Ortiz CS. Physicochemical properties and photodynamic activity of novel derivatives of triarylmethane and thiazine. *Archiv der*

- Pharmazie 2013; 346: 255–265.
- 39 Salvador MA, Reis L V., Almeida P, Santos PF. Delocalized cationic azo dyes containing a thiazole moiety. *Tetrahedron* 2008; 64: 299–303.
- 40 Salvador MA, Almeida P, Reis L V., Santos PF. Near-infrared absorbing delocalized cationic azo dyes. *Dyes and Pigments* 2009; 82: 118–123.
- 41 Song DH, Yoo HY, Kim JP. Synthesis of stilbene-based azo dyes and application for dichroic materials in poly(vinyl alcohol) polarizing films. *Dyes and Pigments* 2007; 75: 727–731.
- 42 Bailey CA, Bailey PS. *Química organica: conceptos y aplicaciones*. 5 ed. Pearson Education: México, 1998.
- 43 Tang C, Hu P, Ma E, Huang M, Zheng Q. Heavy atom enhanced generation of singlet oxygen in novel indenofluorene-based two-photon absorbing chromophores for photodynamic therapy. *Dyes and Pigments* 2015; 117: 7–15.
- 44 Rodriguez-Serrano A, Rai-Constapel V, Daza MC, Doerr M, Marian CM. Internal heavy atom effects in phenothiazinium dyes: enhancement of intersystem crossing via vibronic spin-orbit coupling. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 2015; 17: 11350–8.
- 45 Ji S, Ge J, Escudero D, Wang Z, Zhao J, Jacquemin D. Molecular structure-intersystem crossing relationship of heavy-atom-free bodipy triplet photosensitizers. *Journal of Organic Chemistry* 2015; 80: 5958–5963.
- 46 Houghtaling MA, Perera R, Owen KE, Wagner S, Kuhn RJ, Morrison H. Photobiological properties of positively charged methylene violet analogs. *Photochemistry and photobiology* 2000; 71: 20–28.
- 47 Urrutia MN, Ortiz CS. Spectroscopic characterization and aggregation of azine compounds in different media. *Chemical Physics* 2013; 412: 41–50.
- 48 Emmanuel L, Shukla RK, Sudalai A, Gurunath S, Sivaram S. NaIO<sub>4</sub>/KI/NaCl: a new reagent system for iodination of activated aromatics through in situ generation of iodine monochloride. *Tetrahedron Letters* 2006; 47: 4793–4796.
- 49 Montes de Oca MN, Aiassa IM, Urrutia MN, Argüello GA, Ortiz CS. Separation, purification, and characterization of analogues components of a commercial sample of new Fuchsin. *Journal of Chromatographic Science* 2010; 48: 618–23.

# **CAPÍTULO 3**

## **PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y FOTOQUÍMICAS DE FOTOSENSIBILIZADORES DE SEGUNDA GENERACIÓN**



## 1. RELEVANCIA EN EL DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS

La finalidad primordial de un fármaco es alcanzar una eficacia terapéutica óptima, la cual no depende únicamente de la respuesta biológica ocasionada por la acción de este compuesto en una región específica del organismo a tratar. Es necesario considerar todos los procesos farmacocinéticos involucrados en la terapia (Liberación, Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción) a fin de evaluar su eficacia global. En este contexto, las propiedades fisicoquímicas de los ingredientes farmacéuticos activos tienen un rol principal y pueden condicionar su acción terapéutica.<sup>1</sup> Por lo tanto, un objetivo básico en la investigación y desarrollo de nuevos fármacos es evaluar las propiedades moleculares que limitan su eficacia.<sup>2</sup>

Es importante destacar que la eficacia terapéutica de los Fs, a diferencia de los fármacos convencionales, no sólo depende de sus propiedades fisicoquímicas, sino también de sus características fotofísicas y fotoquímicas, que afectan directamente la capacidad de generar las sustancias citotóxicas responsables del efecto terapéutico.<sup>3</sup> Dependiendo del entorno en el que se disuelva el Fs sus propiedades pueden ser modificadas. Generalmente, se observan desplazamiento de las bandas de absorción, cambios en sus perfiles o intensidades, que condicionan los requerimientos terapéuticos. Determinar el efecto del medio en los compuestos bajo investigación es esencial en el proceso de la TFD y TFDA. Esto permitirá predecir el comportamiento del Fs en condiciones fisiológicas, como así también identificar la especie que presente mejores propiedades para el desarrollo de Fs de tercera generación.<sup>4</sup>

## 2. DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE IONIZACIÓN

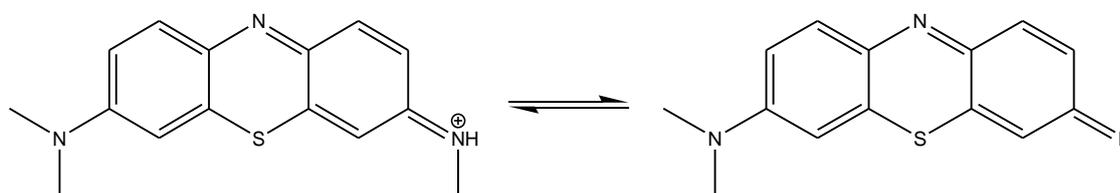
La constante de ionización o de disociación ácida ( $pK_a$ ) de un compuesto se considera un parámetro relevante en numerosos campos de investigación, incluyendo diversos aspectos de la química y diferentes ramas de la biología, medicina e industria alimentaria.<sup>5</sup> El  $pK_a$  de un compuesto se define<sup>5</sup> como el pH en el cual el 50% de las moléculas se encuentran protonadas. Esta constante permite predecir el grado de ionización de una molécula a un pH particular, mediante la aplicación de la ecuación de Henderson-Hasselbalch (**Ecuación 1**).<sup>6</sup>

$$pH = pK_a + \log_{10} \frac{[A^-]}{[HA]}$$

**Ecuación 1**

El grado de ionización de una molécula es una de las propiedades fisicoquímicas más importantes a considerar en el diseño de fármacos. La mayoría de los ingredientes farmacéuticos activos son ácidos o bases débiles y sus valores de  $pK_a$  permiten predecir el grado de ionización de cada compuesto en los fluidos biológicos.<sup>6</sup> Este parámetro tiene un papel fundamental en las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, tales como la distribución en los tejidos, permeabilidad a través de membranas biológicas e interacciones de carga con el sitio blanco. Además, el  $pK_a$  exhibe un impacto relevante en algunas propiedades fisicoquímicas claves, incluyendo la solubilidad y lipofilicidad, las cuales podrían afectar la velocidad de disolución y absorción de los fármacos.<sup>7,8</sup> Por este motivo, los programas de investigación y desarrollo de nuevos agentes terapéuticos involucran la evaluación del equilibrio ácido-base de los posibles candidatos. Los valores de  $pK_a$  se pueden determinar experimentalmente, mediante numerosas técnicas, que incluyen la espectroscopia infrarroja, espectrofotometría UV-Visible, fluorescencia, valoraciones potenciométricas, titulaciones y resonancia magnética nuclear, entre otras.<sup>9</sup>

Los compuestos tiazínicos son catiónicos y generalmente forman soluciones azules intensas, con un máximo de absorción característico a longitudes de onda superiores a los 600 nm. Estudios previos han demostrado que los integrantes de esta familia que contienen uno o más átomos de hidrógeno como sustituyentes de los grupos amino, tales como Tionina (TN), Azure C (AzC), Azure A (AzA) y AzB, se desprotonan en medios fuertemente básicos formando soluciones rosadas que presentan  $\lambda_{max}$  alrededor de los 500 nm.<sup>10</sup> El equilibrio ácido-base de AzB, como prototipo de estos compuestos, se muestra en la **Figura 1**.



**Figura 1:** Equilibrio ácido-base de AzB

Es importante destacar que las tiazinas presentan valores de  $pK_a$  superiores a 11.<sup>10,11</sup> Por este motivo, sólo la especie catiónica está presente en condiciones fisiológicas, propiedad que les confiere alta selectividad como Fs. Numerosos estudios sostienen que las membranas celulares poseen una carga global negativa por lo cual, diferentes moléculas cargadas positivamente pueden adherirse a las células dianas por atracción

electrostática.<sup>12,13</sup> Además, se conoce que el potencial de membrana mitocondrial de las células tumorales es más negativo que el de las células normales, por lo cual estos compuestos permanecerán retenidos durante mayor tiempo en el interior de las células blanco.<sup>14</sup> Por otra parte, los Fs con cargas positivas pueden acumularse selectivamente en bacterias y hongos, en estado planctónico y formando *biofilms*. Esta propiedad se basa en la carga superficial negativa presente en los microorganismos debido a la presencia de moléculas aniónicas, tales como ácido teicoico en bacterias Gram-positivas y lipopolisacáridos en las Gram-negativas, como así también los proteoglicanos presentes en la matriz extracelular de los *biofilms*. Todas estas estructuras producen importantes sitios de unión para Fs catiónicos.<sup>13,15,16</sup>

Como una etapa esencial en el desarrollo de nuevos fármacos, se evaluó el impacto de la bromación en el valor de  $pK_a$  de AzB. Al mismo tiempo se identificaron las formas protonada y neutra de este compuesto y se predijo el grado de ionización del nuevo Fs a distintos valores de pH.

## 2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

A fin de determinar el valor de  $pK_a$  de AzB y AzBBr, se evaluaron los espectros de absorción correspondientes a una solución diluida de estos Fs, lo cual permite evitar su agregación, en diferentes soluciones reguladoras de pH.<sup>17</sup> Todas las muestras se prepararon con un 10 % de etanol (grado pro-análisis, Sintorgan) para favorecer la solubilidad de los compuestos. Las soluciones de AzB y AzBBr presentaron una concentración final de 3,27  $\mu\text{M}$  y 4,73  $\mu\text{M}$  respectivamente.

Las soluciones reguladoras de pH se prepararon con agua ultrapura obtenida del sistema de purificación de agua Milli-Q® (Millipore Corporation), utilizando reactivos de calidad pro-análisis (Cicarelli). Se detalla a continuación la composición de cada una de las soluciones empleadas para la determinación del valor de  $pK_a$  (volumen final de 100 mL):

- pH 1,20: 25 mL de KCl 0,2 M + 42,5 mL de HCl 0,2 M.
- pH 5,80: 50 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M + 36 mL de NaOH 0,1 M.
- pH 7,40: 50 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 19,6 mL de NaOH 0,1 M.
- pH 9,00: 50 mL de Borax 0,025 M + 4,6 mL de NaOH 0,1 M.
- pH 11,00: 50 mL de  $\text{NaHCO}_3$  0,05 M + 22,7 mL de NaOH 0,1 M.
- pH 12,00: 25 mL de KCl 0,2 M + 12 mL de NaOH 0,1 M.
- pH 12,50: 25 mL de KCl 0,2 M + 40,8 mL de NaOH 0,1 M.
- pH 13,00: 25 mL de KCl 0,2 M + 66 mL de NaOH 0,2 M.
- pH 13,18: 25 mL de KCl 0,2 M + 75 mL de NaOH 0,2 M.

El pH correspondiente a cada una de las soluciones se determinó con un pHmetro Altronix MOD. EZDO-PC y la fuerza iónica se ajustó a 0,5 M con cloruro de sodio.

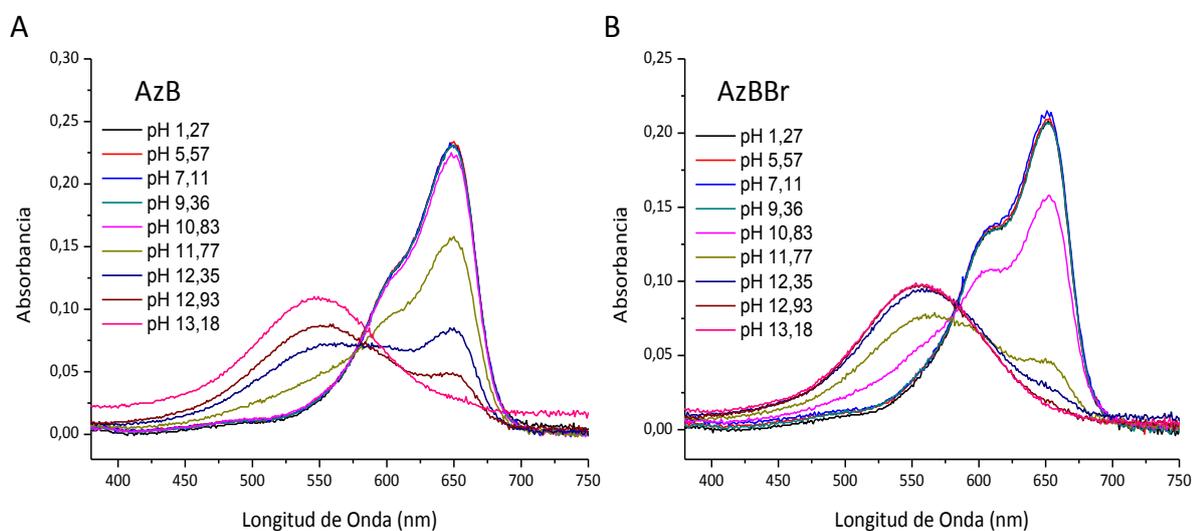
Finalmente, las soluciones de AzB y AzBBr a diferentes valores de pH se analizaron mediante espectrofotometría UV-Visible entre 350 nm y 750 nm, empleando un espectrofotómetro Evolution 300 (Thermo Scientific) y una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y los resultados obtenidos se procesaron con el programa OriginPro 8 SR0.

Los valores de  $pK_a$  se obtuvieron a partir de la representación gráfica del grado de ionización en función del pH. El grado de ionización porcentual (GI) de cada Fs, a los diferentes pH, se determinó a partir de la **Ecuación 2**.<sup>18</sup>

$$GI = \frac{(A_{\lambda \text{ ácido}}/A_{\lambda \text{ base}})_{pH} - (A_{\lambda \text{ ácido}}/A_{\lambda \text{ base}})_{pH \text{ mayor}}}{(A_{\lambda \text{ ácido}}/A_{\lambda \text{ base}})_{pH \text{ menor}} - (A_{\lambda \text{ ácido}}/A_{\lambda \text{ base}})_{pH \text{ mayor}}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

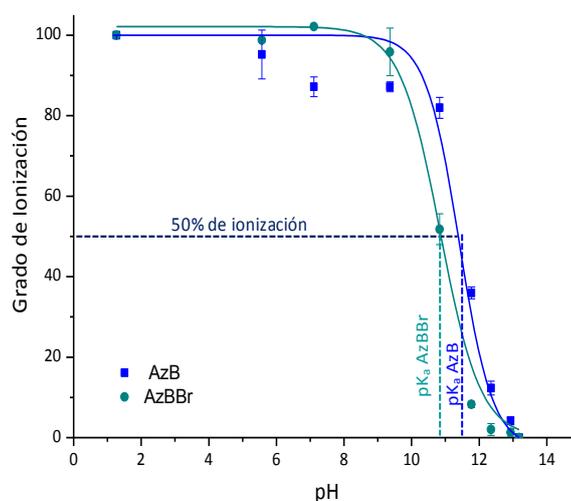
## 2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las curvas espectrales obtenidas para los compuestos AzB y AzBBr en función del pH se muestran en la **Figura 2**. La especie catiónica, protonada o ácida, de ambos Fs, se observa claramente a valores de pH inferiores a 10 y presenta un máximo de absorción a 650 nm y 653 nm para el compuesto comercial y el derivado monobromado respectivamente. Esta especie se evidencia como componente principal hasta un pH próximo a 10. A valores superiores de pH, se observó la presencia de una banda hipsocrómica con un máximo de absorción a 551 nm y 558 nm, correspondiente a la forma neutra, desprotonada o básica, de agentes fototerapéuticos AzB y AzBBr.



**Figura 2:** Espectros de absorción en función del pH: (A) AzB y (B) AzBBr

La determinación de los valores de  $pK_a$  en base a la representación gráfica en función del pH de la solución (**Figura 3**) requirió el cálculo del grado de ionización de cada Fs (**Ecuación 2**), en las soluciones de diferente pH. El valor de la constante de ionización se obtuvo a partir del pH correspondiente al 50% de la ionización de Fs. Los datos de  $pK_a$  determinados para AzB y AzBBr fueron 11,60 y 10,84, respectivamente. Es importante destacar que diferentes autores señalan valores de  $pK_a$  cercanos a 12 para el Fs comercial, lo cual brinda confiabilidad a los resultados obtenidos.<sup>10,11,19</sup>



**Figura 3:** Grado de ionización de los Fs en función del pH.

El valor de  $pK_a$  del nuevo Fs disminuyó con relación al compuesto comercial AzB. Este fenómeno está asociado con la incorporación de un sustituyente aceptor de electrones (Bromo), que por efecto inductivo desplaza la nube de electrones e incrementa la fuerza del ácido.<sup>20,21</sup> A pesar de esta disminución, la forma catiónica de ambos Fs es la única especie presente en condiciones fisiológicas. Esta propiedad favorecería la selectividad de estos compuestos para su posible aplicación en TFD y TFDA.

### 3. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD

Los ensayos de estabilidad tienen como objetivo proporcionar evidencias de la calidad de un ingrediente farmacéutico activo o producto farmacéutico en función del tiempo sometido a la influencia de una variedad de factores ambientales tales como temperatura, humedad y luz. Estos estudios permiten definir las condiciones de almacenamiento, establecer el período de reanálisis y validez de un fármaco o medicamento.<sup>22</sup> La degradación química de un fármaco puede disminuir la

biodisponibilidad del mismo como así también, dar lugar a la formación de productos tóxicos. Conocer la estabilidad de estos compuestos es uno de los principales criterios que contribuyen a determinar la aceptación o rechazo de un medicamento.<sup>23,24</sup>

Numerosos Fs aprobados y otros en estadios avanzados de investigación, presentan la desventaja de ser fácilmente degradables debido a diversos factores tales como actividad enzimática, intensidad de la luz, agua, ácido, oxígeno, temperatura y humedad, como así también frente a una combinación de estos factores.<sup>25</sup> La degradación de los Fs en soluciones simples, así como en entornos complejos, puede visualizarse por la disminución de su intensidad de absorción y/o fluorescencia inicial, lo cual impacta en la reactividad fotoquímica de los mismos.<sup>26</sup> Por este motivo, se evaluó la estabilidad química y fotoquímica de AzB y su derivado monobromado, en condiciones fisiológicas.

### 3.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Previo a la evaluación de la estabilidad química y fotoquímica de los Fs tiazínicos, la metodología espectrofotométrica se validó de acuerdo a los lineamientos establecidos en la *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH).<sup>27</sup>

El proceso de validación de un método analítico involucra diferentes parámetros que deben ser evaluados, entre los que cabe destacar: linealidad, exactitud, precisión, rango, límite de detección y límite de cuantificación.<sup>27,28</sup>

La linealidad de un procedimiento analítico es la capacidad del mismo para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración de analito en un rango acotado. Con la finalidad de determinar este parámetro, es conveniente evaluar indicadores de regresión en un intervalo de confianza definido ( $p= 0,05$ ), tales como el coeficiente de regresión lineal ( $r$ ), la pendiente ( $a$ ) y la ordenada al origen ( $b$ ). Otro indicador muy utilizado para establecer la linealidad del sistema, se sustenta en un ensayo estadístico, que consiste en determinar el valor de *t-Student* para  $r$  con  $n-2$  grados de libertad ( $t_r$ ) y luego compararlo con el valor tabulado para el nivel de confianza requerido (**Ecuación 3**). Es importante destacar, que se recomienda considerar un mínimo de 5 concentraciones para calcular este parámetro.

$$t_r = \frac{r \times \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{1-r^2}}$$

**Ecuación 3**

La exactitud expresa el grado de concordancia entre el valor promedio obtenido (concentración calculada;  $C_c$ ) y el valor verdadero (concentración real;  $C_r$ ). Debe evaluarse utilizando un mínimo de nueve determinaciones, a tres concentraciones diferentes de analito, comprendidas en el rango de linealidad del sistema. Generalmente, la exactitud se informa como porcentaje de recuperación (PR) determinado a partir de la **Ecuación 4**. Además, para garantizar que no existan diferencias significativas entre el valor promedio obtenido y el valor verdadero puede emplearse el ensayo t de Student (**Ecuación 5**), utilizando el porcentaje de recuperación global (PRG, para = 9) y la desviación estándar relativa (RSD, siglas en inglés).

$$PR = \frac{C_c \times 100}{C_r} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$t_{obs} = \frac{(100 - PRG) \times \sqrt{n}}{RSD} \quad \text{Ecuación 5}$$

La precisión de un procedimiento analítico está relacionada con la dispersión de las determinaciones alrededor del valor promedio y corresponde al grado de concordancia, entre ensayos individuales, cuando el método se aplica repetidamente a alícuotas de una muestra homogénea. La repetibilidad, también denominada precisión intra-ensayo, expresa la precisión del método analítico cuando se emplean las mismas condiciones de operación. En este caso, se evalúa todo el procedimiento, desde la preparación de la muestra hasta la medición del analito, sin variar el analista, el día ni los instrumentos. Este parámetro se expresa normalmente como la varianza, desviación estándar (SD, siglas en inglés) o RSD y debería evaluarse utilizando un mínimo de nueve determinaciones en el intervalo de concentraciones establecido (tres concentraciones por triplicado).

El rango de una metodología analítica es el intervalo de concentraciones de analito en que el procedimiento de análisis tiene un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad.

El límite de detección (LD) de un procedimiento analítico es la concentración mínima de analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto. Este parámetro puede calcularse procesando los datos del ensayo de linealidad a partir de la pendiente ( $a$ ) y su desviación estándar ( $\sigma$ ), según la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{a} \quad \text{Ecuación 6}$$

El límite de cuantificación (LC) es la mínima concentración de analito que puede ser determinada cuantitativamente con precisión y exactitud. De manera similar que el LD, este parámetro puede calcularse a partir de la **Ecuación 7**.

$$LC = \frac{10 \times \sigma}{a} \quad \text{Ecuación 7}$$

### 3.1.1. MATERIALES Y MÉTODOS

A fin de validar la metodología aplicada en los estudios de estabilidad de AzB y AzBBr, muestras de diferentes concentraciones se prepararon en soluciones reguladoras de pH 1,2; 5,8 y 7,4 (según metodología descrita en la Sección 2.1.) y se analizaron por espectrofotometría UV-Visible, empleando un espectrofotómetro Evolution 300 (Thermo Scientific) y una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Tres soluciones patrón de cada Fs (1 mg/ 25 mL) se prepararon en soluciones reguladoras de distinto pH, empleando un 10% de etanol como cosolvente. A partir de éstas se realizaron diferentes diluciones por triplicado, comprendiendo concentraciones entre  $3 \times 10^{-6}$  -  $3 \times 10^{-5}$ M, las cuales se analizaron por espectrofotometría UV-Visible. En base a los resultados obtenidos, se determinó el rango de concentraciones de AzB y AzBBr para el cual se cumplen los parámetros de linealidad, exactitud y precisión. Del mismo modo, se determinó el LD y LC, aplicando las ecuaciones detalladas en la Sección 3.1. Los resultados obtenidos se procesaron con el programa OriginPro 8 SR0.

### 3.1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Tabla 1** resume los datos obtenidos en la evaluación de la linealidad del sistema analítico. Los mismos se procesaron a partir de las representaciones gráficas de absorbancia en función de la concentración de los Fs. Valores de  $r^2$  superiores a 0,99 indican un adecuado ajuste al modelo lineal. Además, los datos de  $t_r$  obtenidos fueron superiores a los tabulados ( $t_{\text{tabulado}} = 3,182$  y  $2,776$  para  $n = 5$  y  $n = 6$  respectivamente), lo que afirma la existencia de una correlación lineal estadísticamente significativa entre las variables evaluadas.

Los parámetros necesarios para analizar la exactitud y precisión del procedimiento analítico, se muestran en la **Tabla 2**. Valores de PR (para muestras de igual concentración) y PRG (comprendiendo todo el rango de trabajo) entre 98 y 102% son indicativos de la exactitud del método empleado. Además los datos obtenidos para  $t_{\text{obs}}$

son menores a los tabulados (2,365) para un nivel de significancia del 95% y n=9, por lo que no existen diferencias significativas entre el PRG y el 100% de la recuperación.

**Tabla 1:** Indicadores de la linealidad del método analítico

Fs	pH	Pendiente ( $10^4 M^{-1}$ )	Ordenada al origen	$r^2$	$t_r$
AzB	1,2 <sup>a</sup>	3,77 ± 0,06	0,10 ± 0,01	0,9987	55,43
	5,8 <sup>a</sup>	3,97 ± 0,04	0,10 ± 0,01	0,9992	70,68
	7,4 <sup>b</sup>	3,75 ± 0,08	0,13 ± 0,01	0,9981	39,70
AzBBr	1,2 <sup>a</sup>	3,15 ± 0,05	0,060 ± 0,004	0,9987	55,43
	5,8 <sup>b</sup>	3,36 ± 0,03	0,056 ± 0,002	0,9997	99,98
	7,4 <sup>b</sup>	3,10 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,9994	70,69

<sup>a</sup> Valores determinados para n= 5

<sup>b</sup> Valores determinados para n= 6

**Tabla 2:** Indicadores de exactitud y precisión del método analítico .

Fs	pH	Concentración ( $\mu M$ )	PR (%) <sup>a</sup>	PRG (%) <sup>b</sup>	SD (%) <sup>b</sup>	RSD (%) <sup>b</sup>	$t_{obs}$
AzB	1,2	9,68	99,3	99,5	1,4	1,4	1,071
		14,7	101				
		19,6	98,2				
	5,8	8,11	98,7	99,8	1,2	1,2	0,500
		14,7	101				
		19,6	99,6				
7,4	9,68	99,3	100,2	1,6	1,6	0,375	
	16,2	102					
	22,8	99,3					
AzBBr	1,2	4,42	100	100,03	0,95	0,95	0,095
		6,54	101				
		13,3	99,1				
	5,8	4,42	99,5	100,17	0,76	0,76	0,671
		8,84	101				
		13,3	100				
7,4	8,84	99,3	100,43	0,98	0,98	1,316	
	17,7	101					
	26,5	101					

<sup>a</sup> Valores determinados para n= 3

<sup>b</sup> Valores determinados para n= 9

Definidos los parámetros de linealidad, exactitud y precisión, se determinó el rango de trabajo, LD y LC (**Tabla 3**). A partir de estos valores se seleccionaron las concentraciones óptimas de AzB y AzBBr a fin de desarrollar los estudios de estabilidad en cada solución reguladora de pH.

**Tabla 3:** Indicadores de exactitud y precisión del método analítico.

Fs	pH	Rango ( $\mu\text{M}$ )	LD ( $\mu\text{M}$ )	LC ( $\mu\text{M}$ )
AzB	1,2	9,68 – 19,6	0,7	2,1
	5,8	8,11 – 19,6	0,6	1,8
	7,4	9,68 – 22,8	0,9	2,7
AzBBr	1,2	4,42 – 13,3	0,4	1,3
	5,8	4,42 – 13,3	0,2	0,6
	7,4	8,84 – 26,5	0,6	1,9

## 3.2. ESTABILIDAD QUÍMICA

### 3.2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

La estabilidad química de AzB y AzBBr se evaluó mediante espectrofotometría UV-Visible, y los resultados obtenidos se corroboraron por HPLC. Los ensayos se desarrollaron a 37 °C, durante 48 h, utilizando diferentes soluciones reguladoras de pH fisiológico 1,2; 5,8 y 7,4 (según metodología descrita en la Sección 2.1.). Las muestras se prepararon a partir de una solución patrón de los Fs (1 mg/25 mL) empleando un 10% de etanol para favorecer la solubilidad de los compuestos. A fin de obtener la solución problema para el desarrollo del ensayo ( $\sim 1 \times 10^{-5}$  M), una adecuada dilución se realizó empleando la correspondiente solución reguladora de pH. Es importante resaltar que las muestras se protegieron de la luz durante todo el estudio.

La evaluación de la estabilidad química se realizó a 37°C en un baño termostático Vicking® Masson D. Las determinaciones espectrofotométricas registradas entre 200 y 800 nm, se realizaron en un espectrofotómetro Evolution 300 (Thermo Scientific) y una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Los resultados obtenidos por duplicado se procesaron con el programa OriginPro 8 SR0.

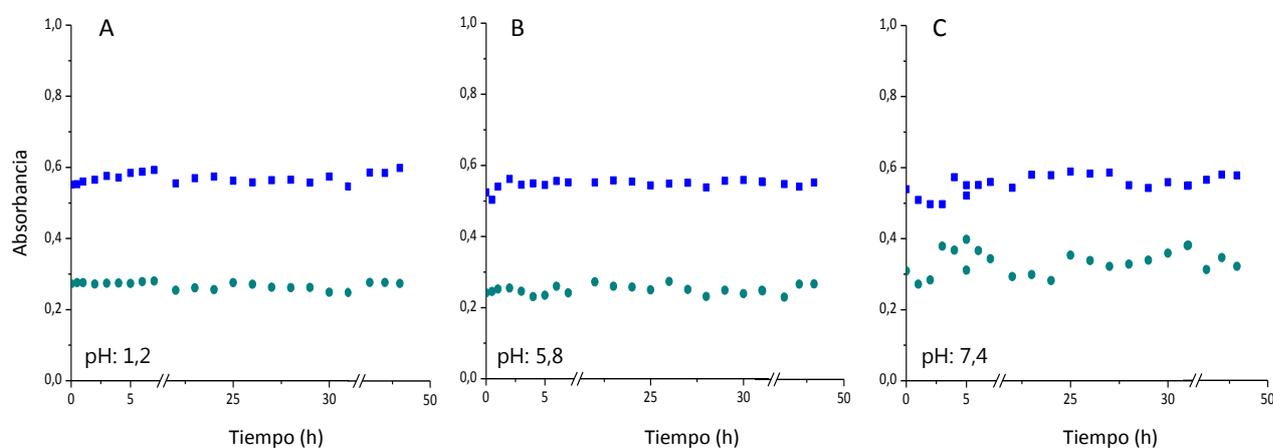
A fin de evaluar la ausencia de productos de degradación, las muestras, a tiempo inicial y final, se analizaron por HPLC empleando un cromatógrafo Agilent 1100 Series (Agilent Technologies) equipado con bomba isocrática, inyector automático, compartimiento termostático para columnas y detector espectrofotométrico UV-Visible de longitud de

onda variable. Se utilizó una columna C<sub>18</sub> Supelco® de fase reversa (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) provista de guarda columna y una velocidad de flujo de 1,0 mL/min. Se empleó una fase móvil de metanol: solución acuosa de fosfato de trietilamina 83 mM (70:30 v/v).

### 3.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

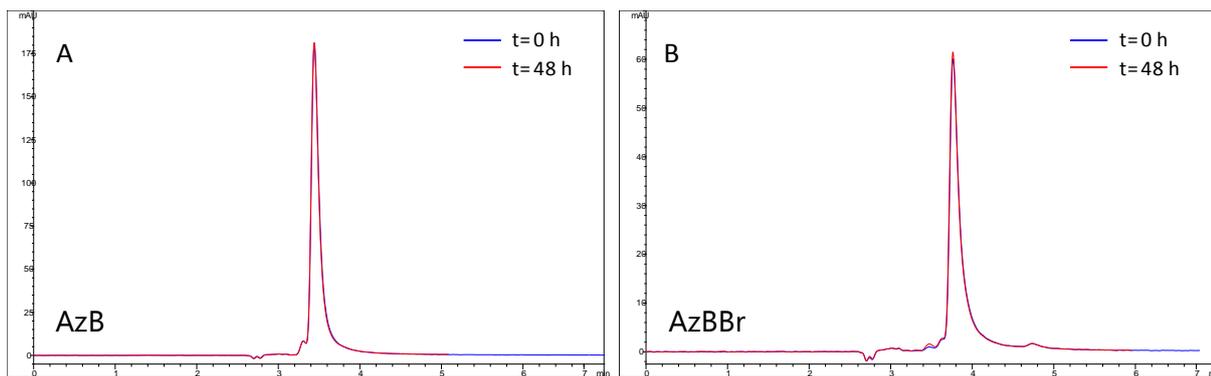
El perfil de las curvas espectrales y los valores de absorbancia a la  $\lambda_{\max}$  de ambos Fs, permanecieron constantes en función del tiempo. Los compuestos AzB y su derivado monobromado presentaron, a los 3 valores de pH evaluados, máxima absorción a 646 nm y 650 nm, respectivamente. Las curvas espectrales obtenidas corresponden a la especie catiónica de los derivados tiazínicos, las cuales se han identificado y discutido en profundidad, en la Sección 2.2 correspondiente a este Capítulo.

A fin de visualizar la estabilidad química de AzB y AzBBr, se representaron gráficamente los datos de absorbancia, a la  $\lambda_{\max}$  de cada Fs, en función del tiempo, a los diferentes valores de pH evaluados. En la **Figura 4**, se puede observar la ausencia de degradación de los Fs en las condiciones experimentales ensayadas.



**Figura 4:** Evaluación de la estabilidad química de AzB (■) y AzBBr (●) en soluciones reguladoras de pH 1,2 (A); 5,8 (B) y 7,4 (C).

Los cromatogramas obtenidos para las muestras a tiempo 0 h y 48 h evidenciaron un único pico con  $t_R$  de  $3,45 \pm 0,02$  min y  $3,82 \pm 0,05$  min para AzB y AzBBr, respectivamente. Estos resultados permitieron corroborar la estabilidad química de los Fs ensayados. La **Figura 5** muestra, a modo de ejemplo, los cromatogramas obtenidos para ambos compuestos en solución reguladora de pH 5,8, a tiempo inicial y final del ensayo.



**Figura 5:** Cromatogramas correspondientes al estudio de estabilidad química de AzB (**A**) y AzBBr (**B**) a pH 5,8.

Los estudios de estabilidad a los pH fisiológicos 1,2; 5,8 y 7,4, demostraron que los Fs tiazínicos estudiados son estables a 37 °C y por 48 h.

### 3.3. ESTABILIDAD FOTOQUÍMICA

#### 3.3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

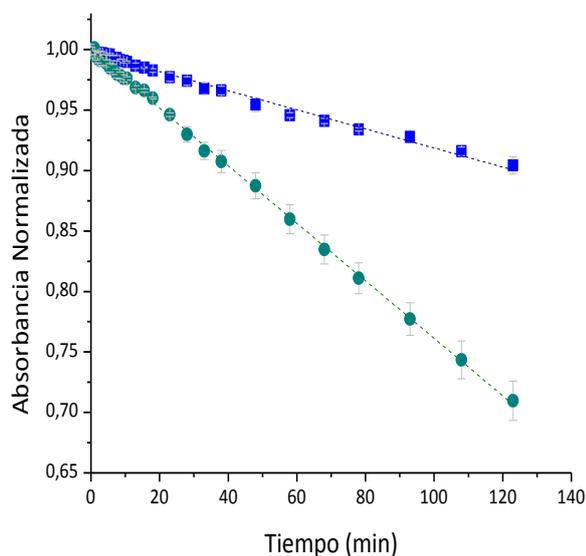
Los ensayos de fotoestabilidad correspondientes a los compuestos AzB y AzBBr ( $\sim 10^{-5}$  M) se desarrollaron en solución reguladora de pH=7,4 y a temperatura ambiente. Las muestras se irradiaron en una celda de cuarzo durante 2 h, utilizando una lámpara LED Parathom® (5w - OSRAM), que presenta un rango de emisión en la región visible del espectro electromagnético (luz blanca fría). La intensidad de irradiación a 5 cm de distancia fue de 8,4 mW/cm<sup>2</sup>. Las muestras recibieron una dosis total de luz de 60,5 J/cm<sup>2</sup> durante el ensayo.

Los espectros de absorción referidos a los agentes fototerapéuticos de AzB y AzBBr, a diferentes tiempos de irradiación, se determinaron entre 200 y 800 nm con un espectrofotómetro Evolution 300 (Thermo Scientific). Finalmente, las muestras a tiempo inicial y final se analizaron por HPLC, empleando la metodología descrita en la Sección 3.2.1. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y los resultados se procesaron aplicando el programa OriginPro 8 SR0.

#### 3.3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las curvas espectrales obtenidas durante el desarrollo de los estudios de fotoestabilidad de AzB y AzBBr, evidenciaron una disminución de los valores de absorbancia, a la longitud de onda de máxima absorción de los Fs, en función de la dosis de luz

administrada. Como se puede observar en la **Figura 6**, la degradación del derivado monobromado fue significativamente mayor que la correspondiente a su precursor, en las condiciones experimentales evaluadas.



**Figura 6:** Decaimiento de la absorbanza de AzB (■) y AzBBr (●) en función del tiempo de irradiación.

La representación gráfica de la concentración en función del tiempo de irradiación, para ambos compuestos, permitió determinar el tiempo de vida útil ( $t_{90}$ ). Los valores de coeficiente de extinción molar determinados previamente (**Tabla 1**; pendiente a pH 7,4), se utilizaron para establecer la concentración de AzB y AzBBr, a los diferentes tiempos de ensayo.

La degradación de ambos compuestos, AzB y AzBBr, se ajustaron a una cinética de orden cero, definida por la **Ecuación 8**, donde  $C_t$  es la concentración a un tiempo determinado,  $k$  es la pendiente,  $t$  es el tiempo y  $C_o$  es la concentración inicial. A partir de estos parámetros se determinó el  $t_{90}$  de cada Fs, aplicando la **Ecuación 9**. En la **Tabla 4** se resumen los valores obtenidos para la cinética de degradación de ambos Fs.

$$C_t = k \times t + C_o \quad \text{Ecuación 8}$$

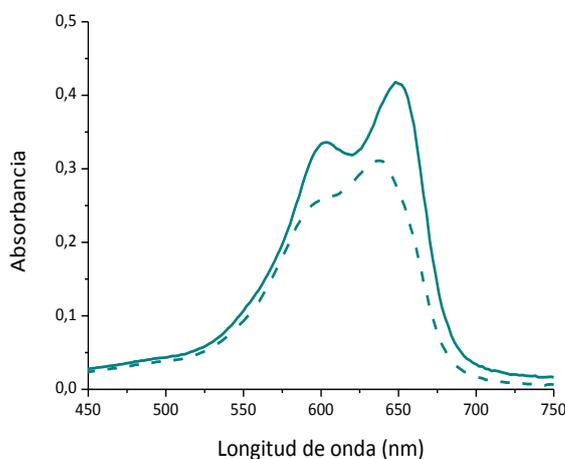
$$t_{90} = \frac{0,1 \times C_o}{k} \quad \text{Ecuación 9}$$

**Tabla 4:** Cinética de fotodegradación.

Fs	Pendiente ( $10^{-8}$ M/min)	Ordenada al origen ( $10^{-5}$ M)	$r^2$	$t_{90}$ ( $\times 10^1$ min)
AzB	$1,3 \pm 0,2$	$1,35 \pm 0,01$	0,9919	$10 \pm 2$
AzBBr	$3,1 \pm 0,2$	$98,2 \pm 0,6$	0,9982	$3,2 \pm 0,2$

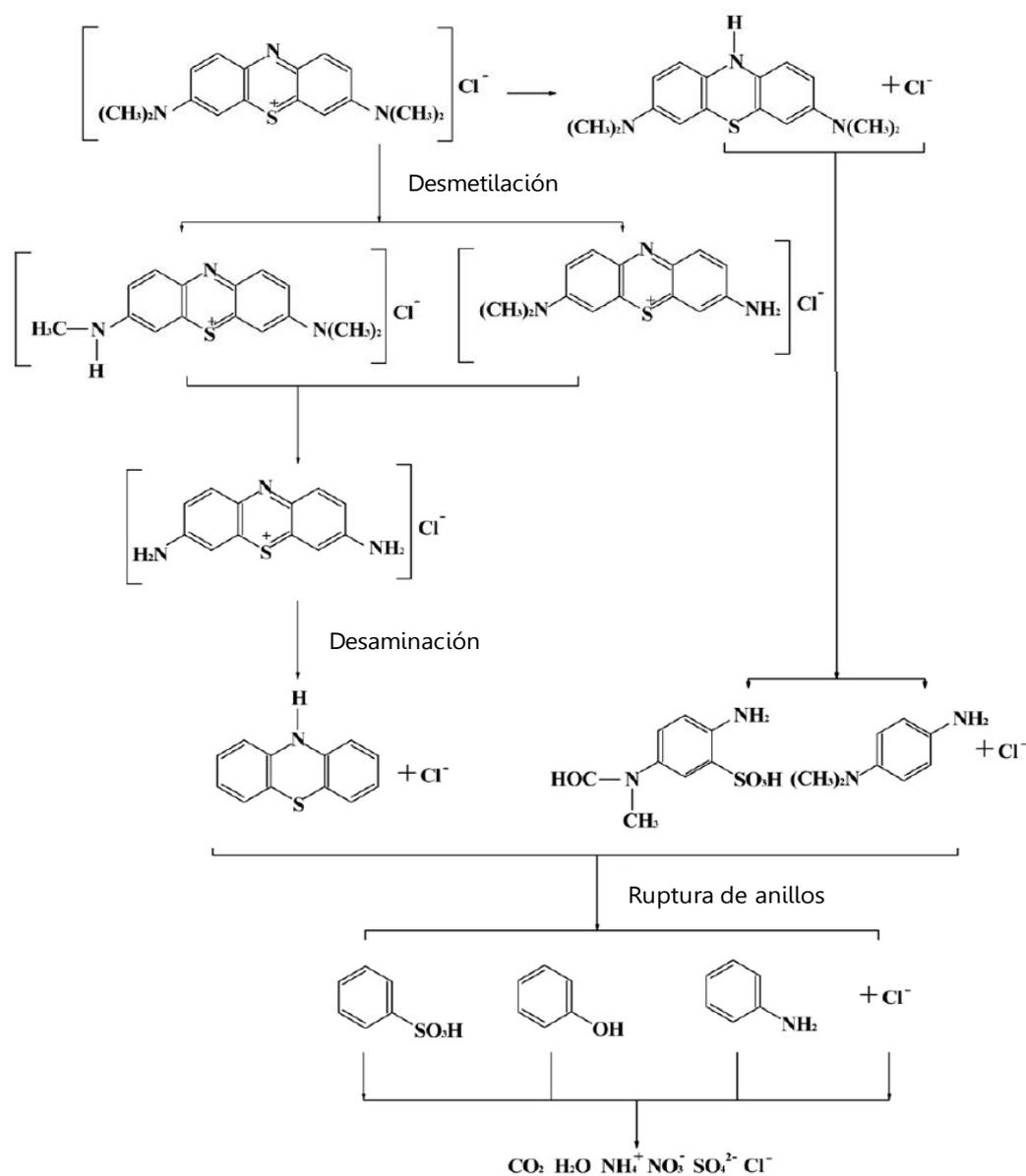
Los resultados obtenidos indican que la bromación de AzB aceleró el proceso de fotodegradación de este Fs. El  $t_{90}$  de AzBBr es 3 veces menor que su precursor.

Además, analizando los perfiles de las curvas espectrales obtenidas durante este estudio, se evidenció un corrimiento hipsocrómico de 10 nm para la banda espectral de AzBBr, en función del tiempo de irradiación (**Figura 7**). Este comportamiento condice con lo descrito por otros grupos de investigación que evaluaron diferentes mecanismos de degradación catalítica de compuestos tiazínicos. Martínez y colaboradores estudiaron la degradación de AzB mediante el proceso sono-electro-Fenton. Los espectros de absorción obtenidos durante la descomposición del Fs, evidenciaron un decaimiento en los valores de absorbancia acompañado de un corrimiento hipsocrómico de la longitud de onda de máxima absorción, hasta la completa desaparición de la banda espectral. Estos resultados sugirieron una degradación completa de AzB, mediante la pérdida de todos o gran parte de los grupos auxocrómicos.<sup>29</sup> Una descripción más detallada de las reacciones involucradas en la degradación de las tiazinas, ha sido publicada para el fotosensibilizador AM, entre las cuales se involucran sucesivas desmetilaciones dando origen a los compuestos AzB, AzA y Th, seguido por la pérdida de los grupos aminos, y la apertura de los anillos aromáticos hasta la completa mineralización del Fs (**Figura 8**).<sup>30</sup>

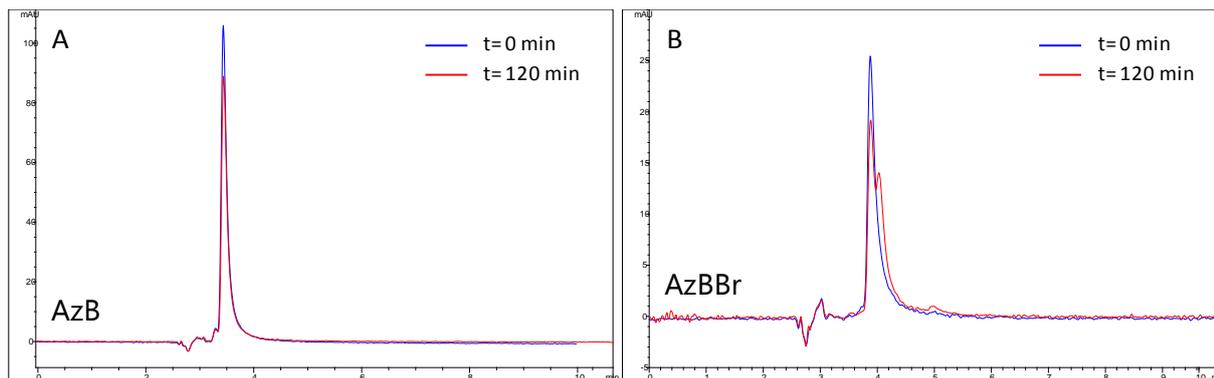


**Figura 7:** Espectro de absorción de AzBBr a diferentes tiempos de irradiación: (—)  $t=0$  min y (---)  $t=120$  min.

La **Figura 9** muestra los cromatogramas obtenidos para AzB y su derivado monobromado a tiempo 0 min y 120 min. El precursor presentó un único pico con  $t_R = 3,45 \pm 0,02$  min ( $n = 4$ ), sin evidenciar productos de degradación. La disminución del área de este pico en función del tiempo de irradiación se corresponde con la inestabilidad fotoquímica observada por espectrofotometría UV-Visible. Por otra parte, al analizar los cromatogramas obtenidos para AzBBr, podemos confirmar que la bromación aceleró la fotodegradación de este Fs. Los cromatogramas no sólo muestran una disminución del área del pico correspondiente a AzBBr,  $t_R = 3,82 \pm 0,05$  min, sino que ponen en evidencia la formación de productos de degradación, mediante la detección de un nuevo pico con  $t_R$  de  $4,02 \pm 0,01$  min.



**Figura 8:** Mecanismo de degradación de AM propuesto por Luan y colaboradores.<sup>30</sup>



**Figura 9:** Cromatogramas obtenidos durante el estudio de fotoestabilidad de AzB (A) y AzBBr (B).

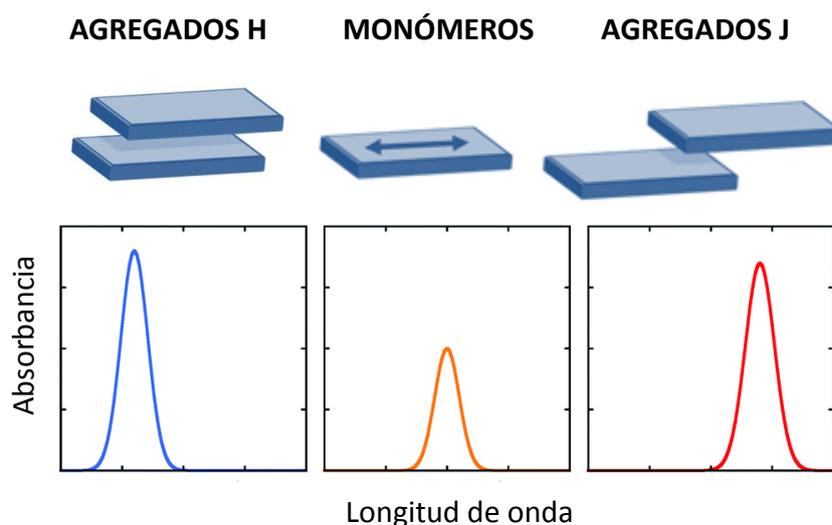
Las dos metodologías aplicadas en el estudio de estabilidad fotoquímica de AzB y AzBBr, permitieron demostrar que la halogenación desestabilizó la estructura del nuevo derivado tiazínico, incrementando la degradación del Fs en las condiciones evaluadas. Además, el valor del  $t_{90}$  correspondiente a cada compuesto es un dato relevante que condicionará la dosis de luz a aplicar en los futuros estudios de actividad fotodinámica.

#### 4. ESTUDIO DE AGREGACIÓN

El fenómeno de agregación consiste en la asociación entre moléculas de soluto en solución, dando origen a ensamblados (agregados) de unidades individuales (monómeros). Este fenómeno surge cuando las interacciones intermoleculares entre las moléculas de soluto se vuelven energéticamente más favorables que la interacción entre el soluto y las moléculas de disolvente.<sup>31</sup> La teoría del excitón molecular de acoplamiento dipolo-dipolo es una de las herramientas teóricas más utilizada para identificar y analizar diferentes tipos de agregados. De acuerdo con este modelo, los agregados paralelos, también conocidos como agregados-H, exhiben una banda de absorción a longitudes de onda menores que sus monómeros, mientras que los agregados cabeza-cola o agregados-J presentan una banda con desplazamiento en dirección al rojo del espectro electromagnético (**Figura 10**).<sup>32,33</sup>

La asociación molecular es fuertemente afectada por varios parámetros tales como estructura y concentración de soluto, temperatura, fuerza iónica y presencia de disolventes orgánicos. La agregación se incrementa con el aumento en la concentración del soluto o la fuerza iónica y disminuye con el incremento de la temperatura o la adición de disolventes orgánicos. Además, la incorporación de sustituyentes hidrofílicos, como el grupo sulfonato, en la estructura de los compuestos produce una disminución

de la agregación, mientras que la inclusión de cadenas alquílicas aumentan este proceso debido a que se incrementan las interacciones hidrófobas en solución.<sup>32,34</sup> Por otra parte, se ha demostrado que la sustitución con grupos voluminosos, como t-butilo, aumenta la concentración de monómero en solución. Este comportamiento se asoció al impedimento estérico, entre las moléculas del sustrato, ocasionado por el sustituyente voluminoso.<sup>35</sup>



**Figura 10:** Conformación típica de agregados H y J. Efecto en los espectros de absorción UV-Visible en relación a su correspondiente monómero.

La interacción molecular que conduce a la agregación es una de las características más importantes de los Fs en solución, ya que afecta su solubilidad, propiedades fotofísicas y fotoquímicas.<sup>32</sup> Existen numerosos antecedentes que demuestran que los Fs iónicos tienden a agregarse en soluciones diluidas conduciendo a la formación de dímeros y agregados mayores. Las interacciones entre las moléculas de Fs producen desplazamientos espectrales significativos y cambios en los perfiles de las bandas de absorción. Por esta razón, la espectrofotometría UV-Visible es una de las metodologías más utilizada para evaluar este fenómeno. Numerosos autores determinaron las tendencias de agregación de diferentes Fs iónicos, tales como AM, TN, CV y representantes de la familia de las Cianinas y los Xanteno, basándose en las desviaciones de la ley de Lambert y Beer.<sup>36</sup> La auto-asociación de estos compuestos tiene consecuencias fundamentales para aplicaciones tan diversas como la tecnología fotográfica, láseres sintonizables, dispositivos fotoelectrónicos moleculares, dispositivos de diagnóstico de despolarización de la fluorescencia y la fotomedicina.<sup>37</sup>

Particularmente en TFD se requiere una concentración adecuada de la especie activa del Fs en el sitio a tratar, durante un tiempo suficiente, a fin de producir el daño celular deseado. La formación de agregados podría alterar significativamente la actividad biológica del Fs ya que, generalmente, sólo especies monoméricas son sensiblemente fotoactivas.<sup>38</sup>

Existen numerosos estudios de agregación de Fs tiazínicos, principalmente relativos a TN y AM, pero sus resultados son inconsistentes y en algunos casos contradictorios. Por ejemplo, el valor de la constante de dimerización de AM varía entre  $4 \times 10^{-3} \text{M}^{-1}$  y  $6 \times 10^3 \text{M}^{-1}$  en soluciones acuosas a 25-30°C.<sup>32,39,40</sup> Esta situación surge como consecuencia de condiciones experimentales mal definidas y numerosas inconsistencias en el procesamiento de los datos espectrales. Todos los trabajos publicados asumen que la forma monomérica de esta familia de Fs está presente en soluciones acuosas, incluso a concentraciones altas, si bien no existen datos experimentales sobre la agregación de los compuestos tiazínicos en solventes monomerizantes a concentraciones bajas del Fs.<sup>39-41</sup> Además, varias publicaciones sugieren una posible estructura dimérica de estos Fs, pero no existen estudios que permitan caracterizar la especie agregada.<sup>42-44</sup>

Por este motivo, se desarrolló un profundo estudio del fenómeno de agregación de AzB y AzBBr en diferentes medios, modificando la temperatura y la concentración de los Fs. Con el fin de analizar la tendencia a la agregación de los compuestos tiazínicos, se evaluó el comportamiento de TN y AM, como representantes de esta familia. Además, se determinaron los valores de las constantes de dimerización de estos Fs.

#### 4.1. EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL FOTSENSIBILIZADOR.

##### 4.1.1. MATERIALES Y MÉTODOS

La agregación de los fotosensibilizadores AzB y su derivado AzBBr se evaluaron en N,N-dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), etanol (EtOH), mezclas EtOH: agua y agua pura. Las soluciones patrón de cada Fs (0,1 mg/ml) se prepararon y diluyeron apropiadamente con el mismo disolvente, a fin de obtener concentraciones del analito en el rango de  $10^{-7}$  M a  $10^{-5}$  M. Las muestras preparadas en los diferentes medios, se analizaron por espectrofotometría UV-Visible en el rango de longitudes de onda de 350 nm a 750 nm, empleando un espectrofotómetro Evolution 300 (Thermo Scientific) y una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos a bajas concentraciones de Fs, se realizaron mediciones en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 utilizando una celda de 5 cm de paso óptico. Los

resultados obtenidos de las mediciones espectrofotométricas se procesaron con el programa OriginPro 8 SR0. Todos los experimentos se realizaron por duplicado con resultados consistentes.

Además, el comportamiento de agregación de TN y AM se estudió en DMF y agua pura, a fin de evaluar el equilibrio monómero-dímero y la formación de agregados de orden superior, respectivamente. Estos estudios permitirán establecer la tendencia de agregación de la familia de compuestos tiazínicos.

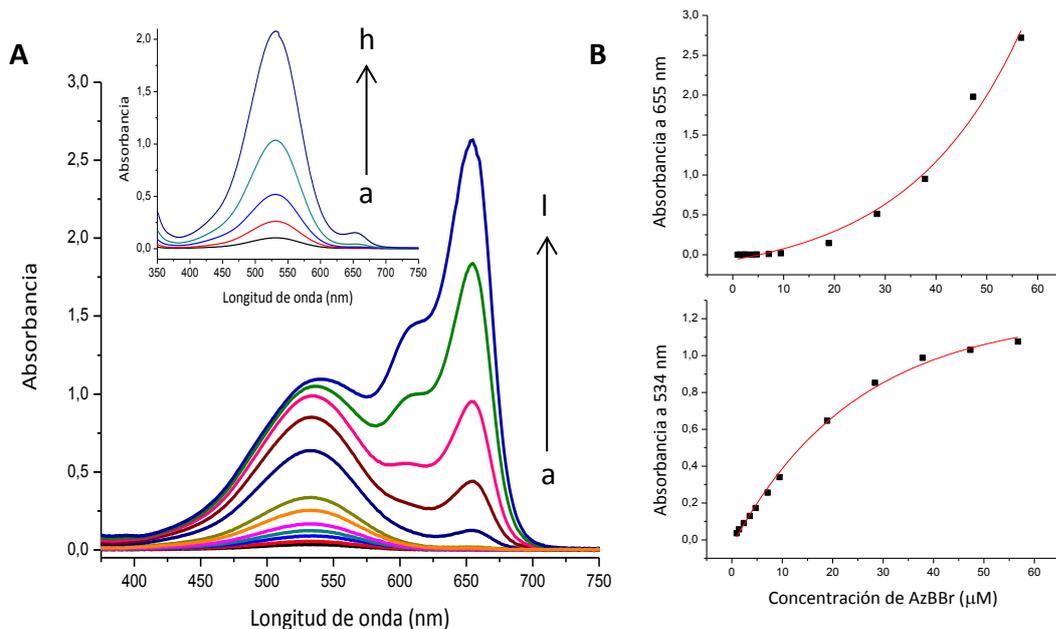
Todos los Fs se adquirieron en Sigma Aldrich y se estudiaron sin purificación adicional, presentando porcentajes de pureza entre 92% y 98%. Los solventes utilizados para las mediciones espectrofotométricas fueron de grado pro-análisis (Cicarelli, Sintorgan, Anedra) y las soluciones acuosas se prepararon en agua ultrapura, mediante el sistema de purificación de agua Milli-Q® (Millipore Corporation).

#### 4.1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

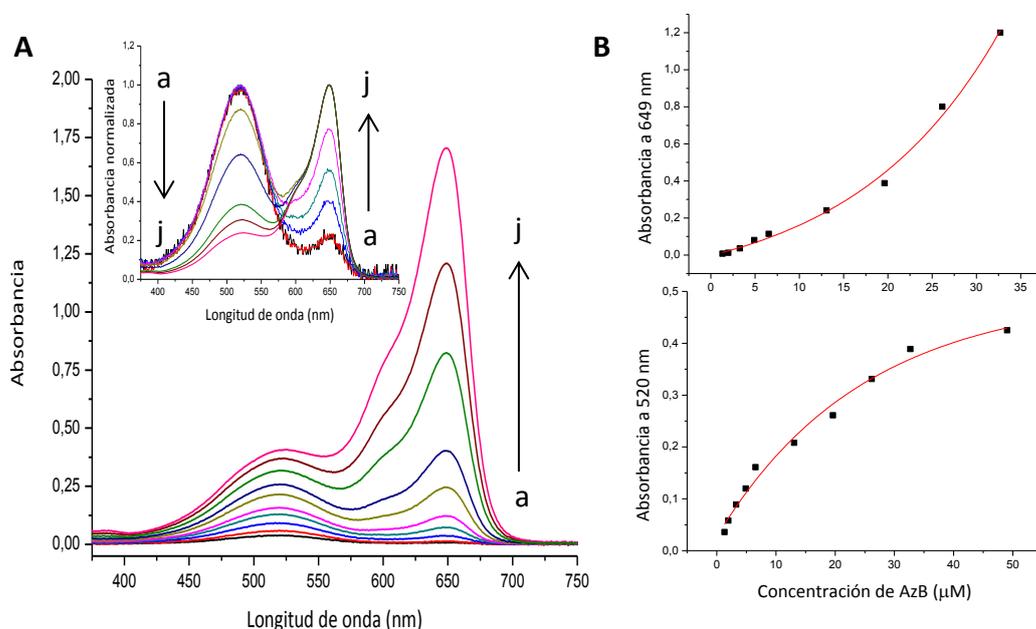
##### 4.1.2.1. Agregación de AzB y AzBBr en solventes orgánicos

Los espectros de absorción UV-Visible registrados para el derivado AzBBr en DMF, se presentan en la **Figura 11A**. A bajas concentraciones del Fs ( $<9,5\mu\text{M}$ ) se observó un único pico con un máximo de absorción a 534 nm. El aumento de la concentración evidenció un incremento en la intensidad de este pico y la detección de uno nuevo a 655 nm. DMF es un solvente monomerizante ampliamente utilizado en estudios de agregación ya que permite evaluar las especies monoméricas.<sup>35,45</sup> Por esta razón, el pico hipsocrómico (534 nm) se asignó al monómero de AzBBr, en tanto que la señal observada a mayores longitudes de onda (655 nm) correspondería a un J-agregado, el cual podría relacionarse con la estructura dimérica del compuesto evaluado. Por otra parte, no se evidenció un cumplimiento de la ley de Lambert-Beer a las longitudes de onda de máxima absorción del monómero como así también del agregado (**Figura 11B**), efecto que corrobora la agregación de este Fs.

Estos resultados son comparables a los obtenidos para el compuesto AzB en el mismo solvente, con la particularidad de que en el intervalo de concentraciones estudiadas, los espectros de absorción presentan dos picos (**Figura 12A**). A 520 nm, se observa una señal no descrita en la literatura, que atribuimos a la forma monomérica, y un segundo pico a 649 nm que pone de manifiesto la formación del J-agregado. También se observó, para este agente fototerapéutico, una desviación de la ley de Lambert-Beer a las longitudes de onda de máxima absorción de la especie monomérica y de la forma agregada (**Figura 12B**).



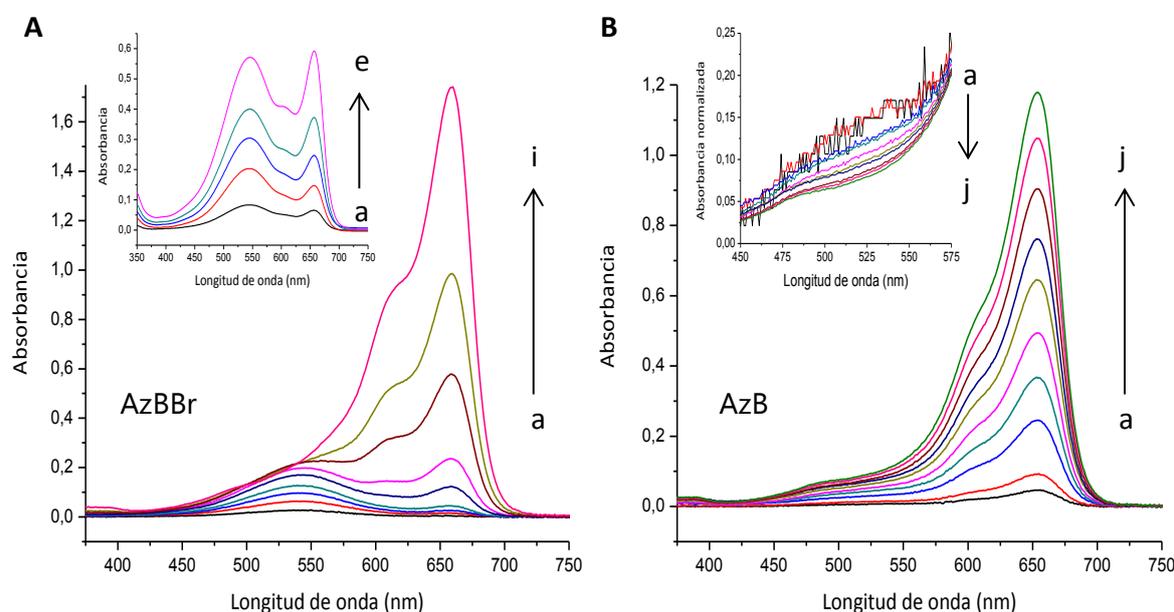
**Figura 11:** Agregación de AzBBr en DMF. **A**-Espectros de absorción en función de la concentración del Fs determinados en una celda de 1 cm de paso óptico. Inserto: espectros obtenidos en una celda de 5 cm. [AzBBr] (a) 0,9  $\mu\text{M}$ ; (h) 18,9  $\mu\text{M}$ ; (l) 56,8  $\mu\text{M}$ . **B**-Curvas de absorbancia en función de la concentración a la  $\lambda_{\text{max}}$  de la especie monomérica (534 nm) y agregado J (655 nm).



**Figura 12:** Agregación de AzB en DMF. **A**- Espectros de absorción en función de la concentración del Fs determinados en una celda de 1 cm de paso óptico. Inserto: espectros de absorción normalizada a la longitud de onda de máxima absorción. [AzB] (a) 1,3  $\mu\text{M}$  (j) 49,1  $\mu\text{M}$ . **B**-Curvas de absorbancia en función de la concentración a la  $\lambda_{\text{max}}$  de la especie monomérica (520 nm) y agregado J (649 nm).

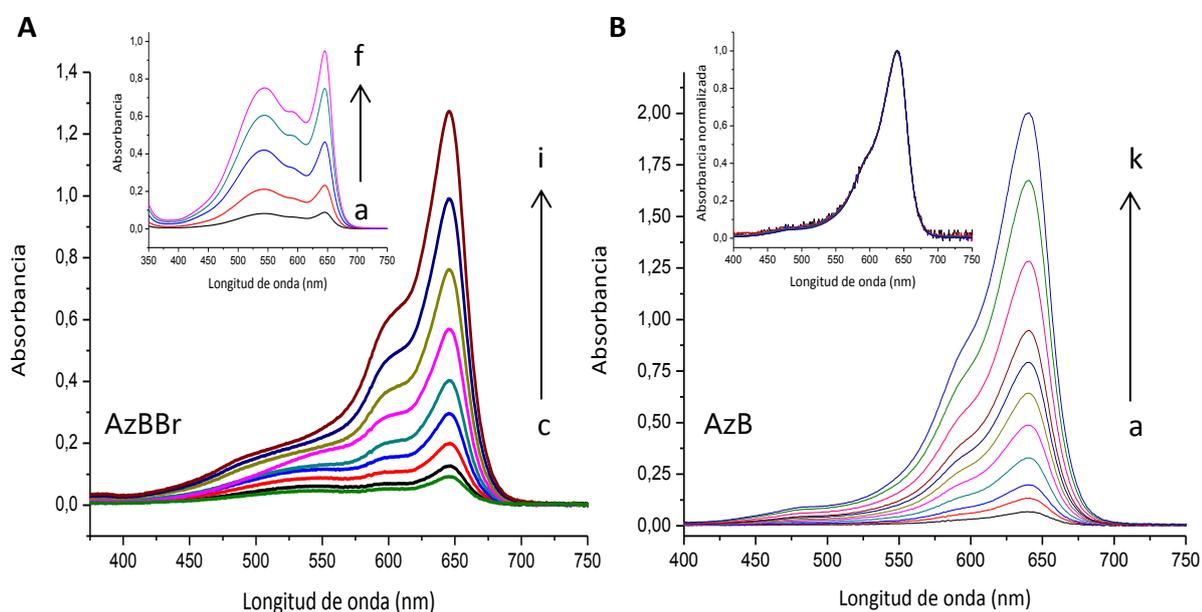
El fenómeno de la agregación de AzBBr y AzB, también se evaluó en DMSO, otro solvente monomerizante ampliamente utilizado.<sup>35,45</sup> El derivado bromado mostró un claro equilibrio entre las formas monoméricas y J-agregados en el intervalo de concentraciones estudiadas (**Figura 13A**). El monómero presentó un pico a 540 nm, mientras en tanto que el máximo de absorción a 659 nm se atribuyó a la forma dimérica, que se transformó en la especie predominante a concentraciones superiores a 7,1  $\mu\text{M}$ . Los espectros de absorción de AzBBr en DMF y DMSO que se muestran en las **Figuras 11A y 13A** revelaron similares perfiles, con la salvedad que en el primer solvente la forma monomérica se presentó como única especie en soluciones diluidas, y el equilibrio monómero-dímero se observó a mayor concentración de Fs que aquella detectada en DMSO.

Las soluciones de AzB en DMSO (**Figura 13B**), presentaron un único máximo de absorción a 654 nm. Las curvas espectrales normalizadas a la  $\lambda_{\text{max}}$  (**Figura 13B, inserto**) evidenciaron que los valores de absorbancia entre 475 nm y 575 nm disminuyeron a medida que se incrementó la concentración del Fs. Este efecto podría atribuirse exclusivamente a la presencia de la especie monomérica de AzB. Al aumentar la concentración del agente fototerapéutico, el equilibrio monómero-dímero se desplaza favoreciendo a la especie dimérica a expensas de su forma no agregada.



**Figura 13:** Agregación de los Fs en DMSO. **A-** Espectros de absorción de AzBBr en función de la concentración del Fs, determinados en una celda de 1 cm de paso óptico. Inserto: espectros obtenidos en celda de 5 cm. [AzBBr] (a) 0,9  $\mu\text{M}$ ; (h) 18,9  $\mu\text{M}$ ; (e) 3,5  $\mu\text{M}$ ; (i) 28,4  $\mu\text{M}$ . **B-** Espectros de absorción de AzB en función de la concentración del Fs, determinados en celda de 1 cm de paso óptico. Inserto: espectros de absorción normalizada a la  $\lambda_{\text{max}}$ , ampliado entre 450 nm y 575 nm. [AzB] (a) 0,7  $\mu\text{M}$  (j) 14,7  $\mu\text{M}$

En EtOH, ambos Fs mostraron una absorbancia máxima predominante, correspondiente al J-agregado. El derivado monobromado presentó un máximo de absorción a 648 nm (**Figura 14A**), en tanto que los espectros de absorción normalizada, a esa longitud de onda evidenciaron, que la absorbancia a aproximadamente 550 nm disminuye a medida que la concentración de Fs aumenta; efecto que podría atribuirse a la presencia de las especies monoméricas. A fin de corroborar estos resultados, las mediciones se realizaron utilizando una celda de 5 cm de paso óptico (**Figura 14A, inserto**). Las curvas obtenidas permitieron detectar con claridad un pico a 545 nm y un máximo a 648 nm. Por lo tanto, estos estudios evidenciaron la presencia de la especie monomérica a bajas concentraciones de AzBBr con un máximo cercano a 550 nm, y la banda batocrómica asignada a la formación de J-agregados. Las curvas espectrales de AzB registradas en EtOH demostraron un solapamiento a todas las concentraciones estudiadas y presentaron un máximo de absorción a 640 nm, atribuido a la forma dimérica. En este caso, no se observó la banda de absorción correspondiente a la especie monomérica (**Figura 14B**).



**Figura 14:** Agregación de los Fs en EtOH. **A-** Espectros de absorción de AzBBr en función de la concentración del Fs, determinados en una celda de 1 cm de paso óptico. Inserto: espectros en celda de 5 cm. [AzBBr] (a) 0,9  $\mu\text{M}$ ; (c) 3,5  $\mu\text{M}$ ; (f) 9,5  $\mu\text{M}$ ; (i) 28,4  $\mu\text{M}$ . **B-** Espectros de absorción de AzB en función de la concentración del Fs, determinados en una celda de 1 cm de paso óptico. Inserto: espectros de absorción normalizada a la  $\lambda_{\text{max}}$ . [AzB] (a) 0,7  $\mu\text{M}$ ; (k) 19,6  $\mu\text{M}$

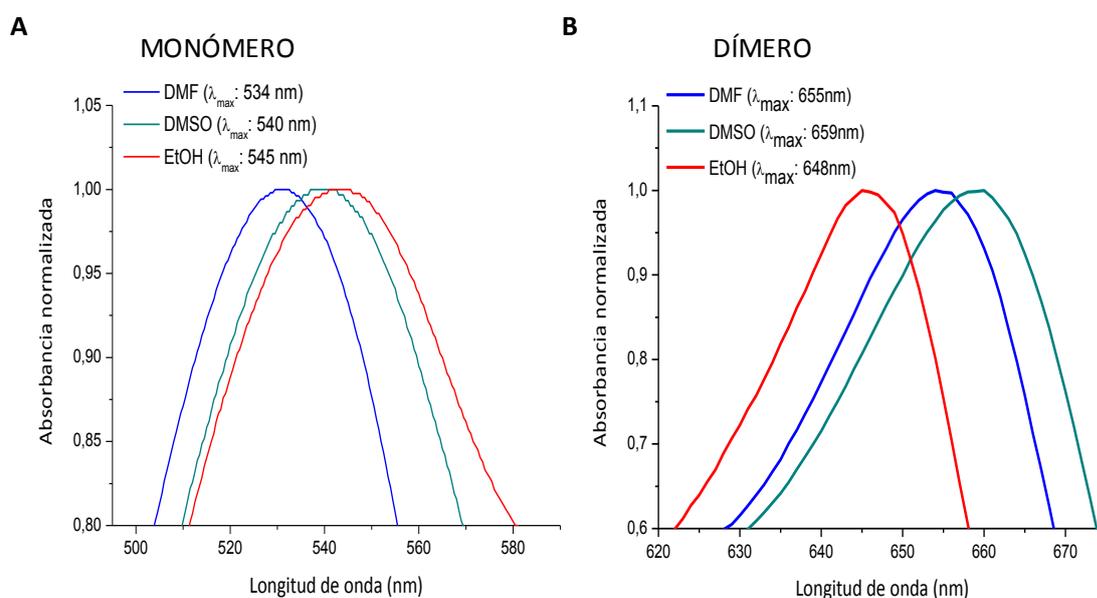
Los estudios desarrollados permitieron la correcta identificación de la especie monomérica de los compuestos tiazínicos. Se observó el equilibrio entre monómero y J-agregado para AzBBr y AzB, confirmando que los solventes orgánicos evitan la formación de los agregados. Además, en las condiciones experimentales evaluadas, la especie monomérica de AzBBr se vio más favorecida que el monómero del precursor (AzB). La forma monomérica del derivado bromado fue la única especie detectada a bajas concentraciones del Fs en DMF ( $<9,5 \mu\text{M}$ ), **Figura 11A**. También, se observó la presencia del monómero del nuevo derivado en medios con menor poder monomerizante, tales como DMSO y EtOH. Este efecto podría atribuirse al impedimento estérico causado por la incorporación de un sustituyente voluminoso, tal como bromo, lo que dificultaría el acercamiento de las moléculas del Fs, y por lo tanto las interacciones intermoleculares que estabilizan el agregado.<sup>46</sup> Numerosos estudios manifiestan que la constante de dimerización de una serie de compuestos disminuye cuando el volumen de los sustituyentes aumenta. Monaham y colaboradores demostraron que la sustitución de un grupo metilo por un sustituyente etilo o isopropilo produce cambios significativos en la estabilidad de la forma dimérica, lo que se refleja en la disminución de las constantes de dimerización.<sup>47</sup> Otros autores han demostrado que los sustituyentes voluminosos como el grupo ter-butilsulfonilo, presentan mayor inhibición de la agregación que los correspondientes a las cadenas alquílicas largas.<sup>35</sup> Sin embargo, grupos menos voluminosos tales como metilo presentaron significativos efectos estéricos en la agregación de diferentes compuestos, ocasionando una marcada disminución en las constantes de dimerización.<sup>32</sup> Los radios de van der Waals del átomo de bromo y del grupo metilo son similares; por lo tanto, el impedimento estérico causado por éstos, puede ser comparable.<sup>48,49</sup> Además, estudios previos han demostrado que la bromación de Rojo Neutro, compuesto con estructura similar a las tiazinas, provoca una disminución en la formación de agregados.<sup>50</sup>

Es importante destacar que el fenómeno de agregación no se debe confundir con el solvatochromismo, efecto que permite explicar los desplazamientos espectrales observados por cambios en la polaridad del solvente al evaluar un analito a una única concentración en diferentes medios.<sup>51</sup> El análisis del efecto causado por el incremento de la concentración de los Fs en un mismo medio es un parámetro directamente relacionado con el equilibrio monómero-agregado.

Las especies monoméricas y J-agregados de AzBBr y AzB se analizaron a la misma concentración en DMF, DMSO y EtOH con el fin de evaluar el efecto solvatochrómico. Ambas especies correspondientes a los Fs en estudio presentaron desplazamientos

batocrómicos con el incremento de la polaridad del medio, efecto conocido como solvatocromismo positivo.<sup>52</sup> Los parámetros comúnmente utilizados para determinar la polaridad de los solventes son la constante dieléctrica y la escala  $E_T(30)$ . El primer parámetro representa el efecto del medio sobre la orientación de moléculas cargadas o polares en un campo eléctrico (interacciones entre cargas), en tanto que el segundo es un descriptor de los enlaces de hidrógeno y las interacciones electrostáticas.<sup>53,54</sup>

La **Figura 15** muestra las curvas de absorción de la especie monomérica y dimerica de AzBBr en los diferentes solventes evaluados. Se observó un desplazamiento batocrómico de las especies monoméricas de AzBBr a medida que el valor  $E_T(30)$  de los solventes aumenta (valores  $E_T(30)$ : 43,8 (DMF); 45 (DMSO); 51,9 (EtOH)<sup>55</sup>). Por otra parte, el J-agregado de este Fs evidenció máximos espectrales a 648 nm, 655 nm y 659 nm en EtOH, DMF y DMSO, respectivamente. Este comportamiento está relacionado con un efecto solvatocrómico positivo, si consideramos la constante dieléctrica como un indicador de la polaridad del disolvente (valor constante dieléctrica: 24,5 (EtOH); 37 (DMF); 47 (DMSO)<sup>55</sup>).



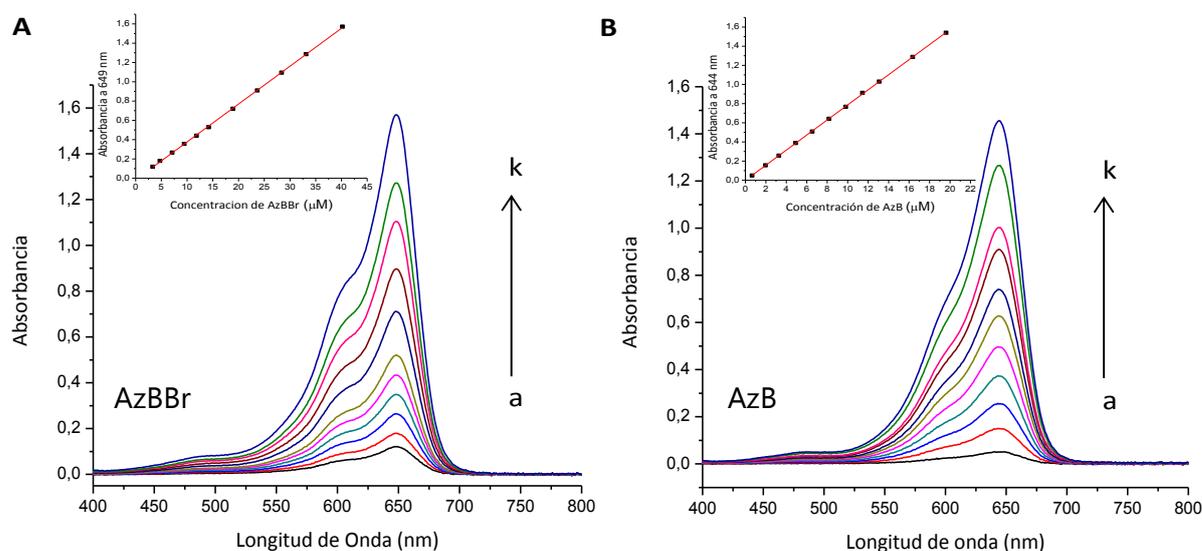
**Figura 15:** Efecto solvatocrómico de la especie monomérica (**A**) y dimerica (**B**) de AzBBr, evaluadas a la concentración de Fs de 4,7  $\mu\text{M}$  y 28,4  $\mu\text{M}$  respectivamente.

Los resultados obtenidos evidencian que la formación de dímeros implica diferentes interacciones intramoleculares que afectan los enlaces entre el Fs y el disolvente. Las especies monoméricas pueden generar interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno con el solvente, mientras que la solvatación de dímeros estaría más influenciada por las interacciones electrostáticas.

## 4.1.2.2. Agregación de AzB y AzBBr en mezclas EtOH: agua y agua pura.

Las curvas espectrales normalizadas correspondientes a AzBBr (**Figura 16A**) y AzB (**Figura 16B**) en EtOH: agua (75:25 v/v) son superponibles en el rango de concentraciones evaluadas, con una longitud de onda de máxima de absorción a 649 nm y 644 nm, respectivamente. Los espectros de absorción de ambos compuestos presentan un hombro hipsocrómico ( $\approx 600\text{nm}$ ) independiente de la concentración del Fs, el cual se atribuye a transiciones vibracionales desde el subnivel más bajo en el estado fundamental, al segundo subnivel en el estado excitado.<sup>56</sup>

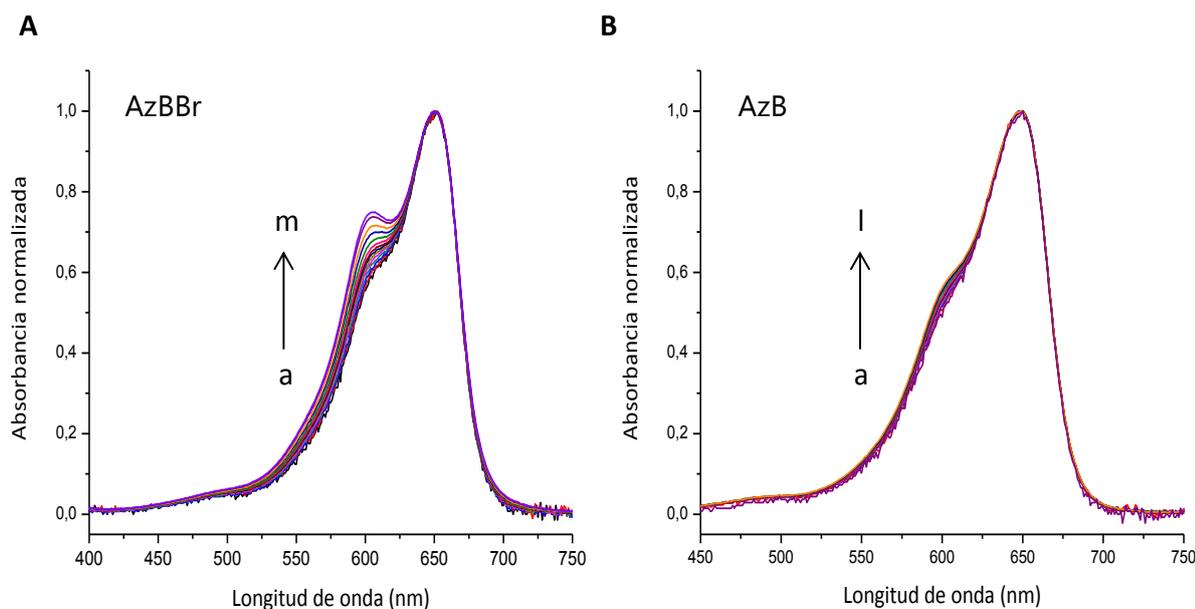
Estos espectros de absorción podrían ser atribuidos a los J-agregados de cada compuesto, de acuerdo a los resultados obtenidos en solventes orgánicos puros (Sección 4.1.2.1). En las condiciones experimentales ensayadas, no se detectaron las bandas monoméricas correspondientes a AzB y AzBBr. Como era de esperar, en la mezcla EtOH: agua (75: 25 v/v) ambos Fs se ajustaron a la Ley de Lambert-Beer en los intervalos de concentraciones evaluadas, lo que indica la existencia de una única especie en solución (**Figura 16, insertos**).



**Figura 16:** Agregación de AzBBr (**A**) y AzB (**B**) en mezcla EtOH: agua (75:25 v/v). Inserto: Curvas de absorbancia en función de la concentración del Fs.

[AzBBr] (a) 3,3  $\mu\text{M}$ ; (k) 40,2  $\mu\text{M}$ . [AzB] (a) 0,7  $\mu\text{M}$ ; (k) 19,6  $\mu\text{M}$

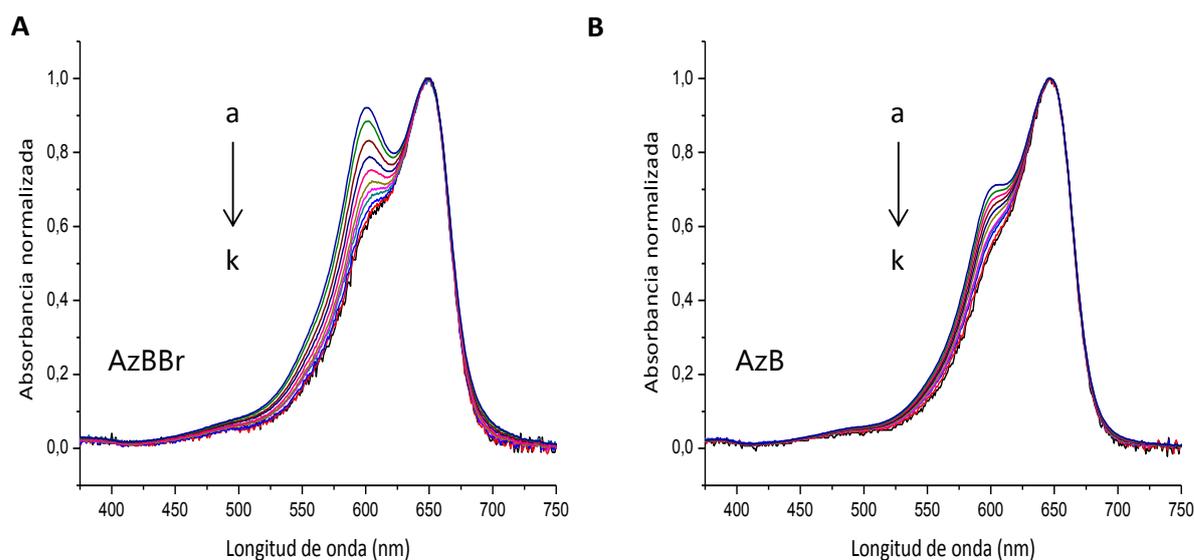
Al estudiar ambos Fs en la mezcla EtOH: agua (10:90 v/v), se observó un aumento en los valores de absorbancia correspondiente al hombro hipsocrómico en función de la concentración de AzBBr (**Figura 17A**) y AzB (**Figura 17B**). El derivado monobromado, demostró que el hombro se transformó en un nuevo pico de absorción con un máximo a 607 nm.



**Figura 17:** Agregación de AzBBr (**A**) y AzB (**B**) en mezcla EtOH: agua (10:90 v/v).  
 [AzBBr] (a) 3,3  $\mu\text{M}$ ; (m) 47,3  $\mu\text{M}$ . [AzB] (a) 2,0  $\mu\text{M}$ ; (l) 26,2  $\mu\text{M}$

Los estudios realizados en agua pura, indicaron que el hombro de ambos compuestos aumentó significativamente. Estos resultados sugieren que AzBBr (**Figura 18A**) y AzB (**Figura 18B**) forman agregados superiores en medio acuoso, siendo el derivado monobromado el que presenta mayor tendencia a la agregación. Además, la forma monomérica de estos Fs no se detectó en solución acuosa. Es importante destacar, que el pico atribuido a los agregados de mayor orden presenta un máximo de absorción identificado entre los picos correspondientes al monómero y dímero, por lo que se evidencia un desplazamiento batocrómico en comparación con el pico atribuido al monómero, pero hipsocrómico con relación al agregado. En general, los datos bibliográficos relativos a la agregación de diferentes Fs, presentan una correlación lineal entre el grado de agregación y el desplazamiento espectral. Sin embargo, se conoce que los cambios espectrales ocasionados por la agregación sólo dependen de la orientación mutua de los componentes. Por esta razón, es viable que algunos compuestos puedan formar dímeros J o H, los que podrían dar lugar a diferentes tetrámeros (ensamblados en forma de escalera, ladrillos o lineales) con desplazamientos hacia el rojo o azul respecto a su agregado menor o incluso las formas monoméricas.<sup>57</sup>

Como conclusión parcial, podemos afirmar que la incorporación de un átomo de bromo a la estructura de AzB desestabilizó el J-agregado, que podría atribuirse a un dímero, desplazando el equilibrio hacia la especie monomérica en solventes orgánicos, como así también a la formación de agregados mayores en solución acuosa.



**Figura 18:** Espectros de absorción normalizada a la  $\lambda_{\max}$  del Fs, en agua pura, en función de la concentración de AzBBr (**A**) y AzB (**B**). [AzBBr] (a) 3,3  $\mu\text{M}$ ; (k) 40,2  $\mu\text{M}$ . [AzB] (a) 2,0  $\mu\text{M}$ ; (k) 29,4  $\mu\text{M}$ .

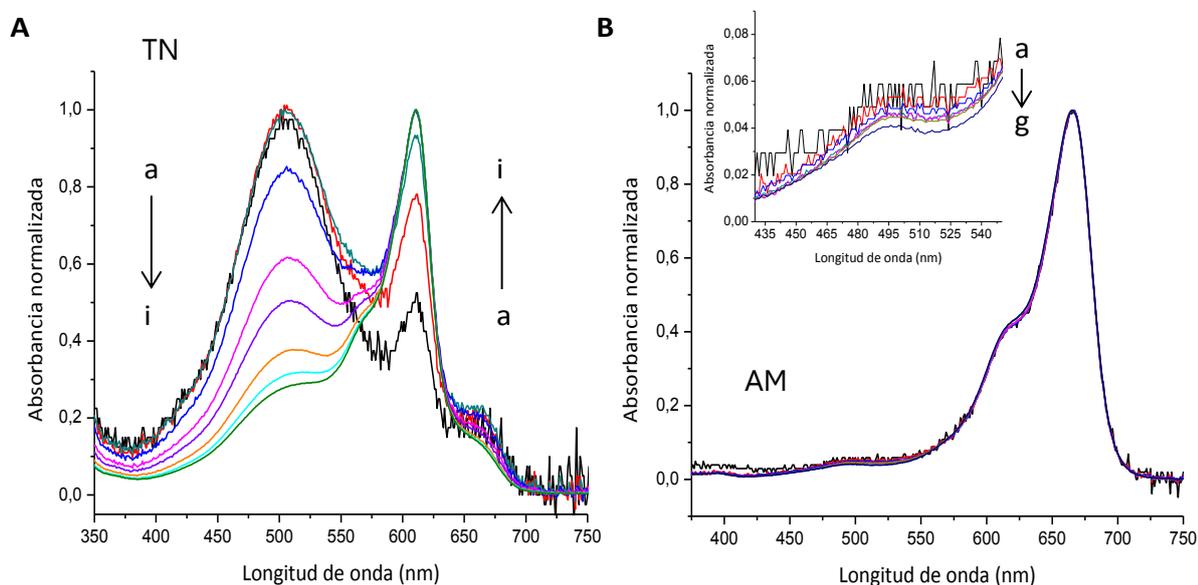
#### 4.1.2.3. Agregación de TN y AM en DMF y agua pura

Los espectros de absorción normalizados de AzB (**Figura 12A, inserto**) y TN (**Figura 19A**) en DMF demostraron que estos Fs exhiben un comportamiento similar. En el rango de concentraciones ensayadas ambos compuestos evidenciaron dos picos de absorción: uno de ellos, no reportado en la literatura, que corresponde a la especie monomérica (observado aproximadamente a 500 nm) y otro que se atribuye a la formación de agregados J (observado a longitudes de onda mayores a 600 nm). Este último pico es asignado en la literatura a la especie monomérica de ambos Fs.

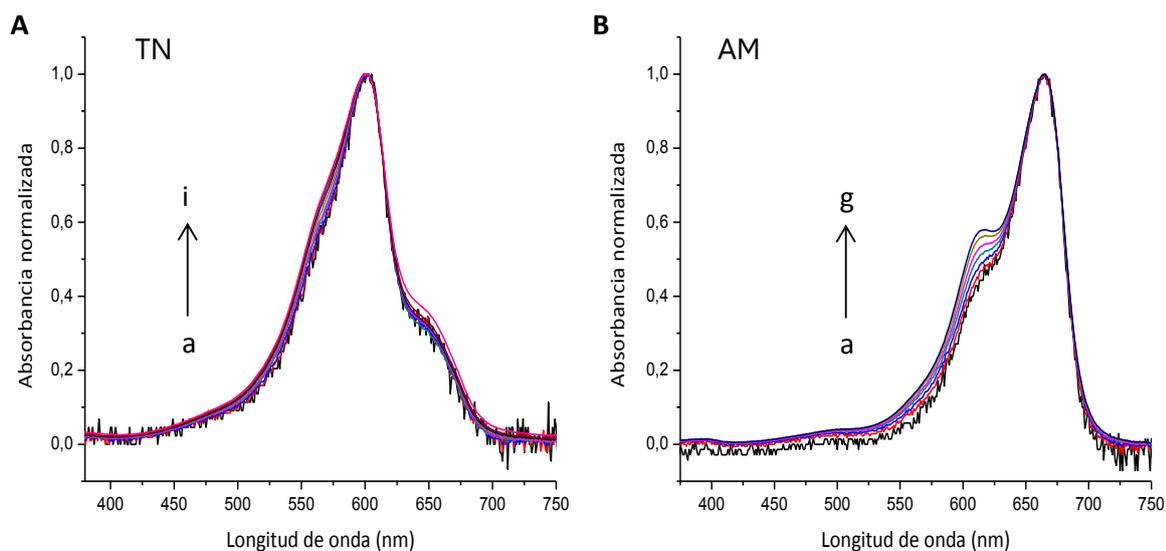
Los espectros de absorción que presenta AM en DMF (**Figura 19B**) muestran un pico predominante con máximo de absorción a 666 nm. En las curvas normalizadas (**Figura 19B, inserto**) se observó una disminución de la absorbancia a aproximadamente 500 nm, cuando se incrementa la concentración de Fs. Los agentes fototerapéuticos AzBBr, AzB y TN mostraron un pico definido alrededor de 500 nm, lo cual contrasta con el resultado obtenido para el compuesto AM. Este resultado permitió inferir que, al igual que los otros Fs tiazínicos evaluados, la forma monomérica de AM presenta un máximo de absorción a aproximadamente 500 nm.

Por otra parte, los estudios de estos Fs en agua pura no evidenciaron el pico correspondiente a la especie monomérica (**Figura 20**). Los espectros de absorción mostraron los picos correspondientes a sus respectivos J-agregados. Además, se observó una nueva banda en alrededor de 550-625 nm con el incremento de la concentración de

los Fs, lo que se atribuyó a la formación de agregados de orden superior. Este efecto fue menos marcado para el compuesto TN (**Figura 20A**), en tanto que se evidenció claramente por AM (**Figura 20B**), AzB (**Figura 18B**) y AzBBr (**Figura 18A**).



**Figura 19:** Espectros de absorción normalizada a la  $\lambda_{\max}$  del Fs, en función de la concentración de TN (**A**) y AM (**B**) en DMF. Inseto: ampliación del espectro entre 430 nm y 445 nm. [TN] (a) 1,5  $\mu\text{M}$ ; (i) 36,4  $\mu\text{M}$ . [AM] (a) 1,3  $\mu\text{M}$ ; (g) 25,0  $\mu\text{M}$ .



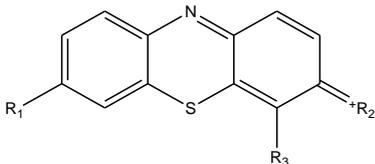
**Figura 20:** Espectros de absorción normalizada a la  $\lambda_{\max}$  del Fs, en función de la concentración de TN (**A**) y AM (**B**) en agua pura. [TN] (a) 1,5  $\mu\text{M}$ ; (i) 80,1  $\mu\text{M}$ . [AM] (a) 1,3  $\mu\text{M}$ ; (g) 31,3  $\mu\text{M}$ .

## 4.1.2.4. Tendencia a la agregación de AzB, AzBBr, TN y AM

Los resultados obtenidos para todos los Fs tiazínicos evaluados en DMF (**Figura 11**, **Figura 12** y **Figura 19**) permitieron determinar la siguiente tendencia de dimerización: AM > TN  $\approx$  AzB > AzBBr. Debido a que la agregación es un fenómeno complejo, varios factores deben ser analizados para interpretar este comportamiento.

El compuesto AM incluye en su estructura dos aminas terciarias como sustituyentes, en tanto que las tiazinas restantes presentan una amina primaria o secundaria en las posiciones R<sub>2</sub> de la estructura del Fs (**Esquema 1**). Los átomos de hidrógeno de estos sustituyentes pueden interactuar con las moléculas de DMF y por lo tanto estabilizar a la forma monomérica. Numerosa literatura sostiene que los monómeros están presentes en solución, cuando las fuerzas que favorecen la solvatación de estas especies son más fuertes que las interacciones intramoleculares de los compuestos evaluados.<sup>31,58</sup> Por esta razón, AM es el Fs que presenta mayor dimerización. El compuesto AzB posee sólo un átomo donador de enlaces puente hidrógeno, a diferencia de TN que incluye en su estructura dos aminas primarias capaces de generar este tipo de uniones. Por este motivo, AzB debería presentar mayor tendencia a la dimerización que TN. Por otra parte, los sustituyentes metilo presentes en AzB podrían favorecer la presencia de las especies monoméricas por un incremento en el impedimento estérico. La combinación de estos factores, explican la similitud que se evidencia en el análisis de agregación de ambos Fs en DMF (**Figura 12** y **Figura 19A**). Finalmente, la comparación de los resultados obtenidos para AzB y AzBBr evidenciaron claramente el efecto causado por sustituyentes voluminosos. La sustitución de un átomo de hidrógeno por un átomo de bromo en la estructura de AzB, sin modificar el grupo donador de enlaces de hidrógeno presentes en los Fs, desestabilizó el J-agregado y contribuyó a la presencia de la especie monomérica de AzBBr.

**Esquema 1:** Estructura química de los Fs tiazínicos estudiados

	Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
	AzB	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	NH(CH <sub>3</sub> )	H
	AzBBr	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	NH(CH <sub>3</sub> )	Br
	TN	NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	H
	AM	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H

Por otra parte, la agregación de los compuestos tiazínicos en agua presentó el siguiente orden: AzBBr > AzB  $\approx$  AM > TN (**Figura 18** y **Figura 20**). Numerosa bibliografía demuestra que, en soluciones acuosas, los compuestos lipofílicos exhiben mayor tendencia a agregarse que los derivados hidrofílicos, debido a repulsiones hidrófobas con el medio.<sup>59</sup> En concordancia con estos antecedentes, TN (el compuesto más hidrofílico)<sup>60</sup> presenta una menor tendencia a la formación de agregados de orden superior, en tanto que el derivado AzBBr (el Fs más lipofílico)<sup>61</sup> evidenció mayor tendencia a la agregación en solución acuosa. Además, AM y AzB, que presentan valores de lipofilicidad similares,<sup>60,62</sup> evidenciaron efectos de agregación comparables en agua. Estos resultados coinciden con los publicados por Chakraborty y colaboradores, quienes estudiaron el fenómeno de agregación de TN, AzB y AM, entre otros compuestos, y sugirieron que la lipofilicidad de las moléculas aumenta la tendencia a la agregación, a excepción de AM que presentó menor agregación debido al impedimento estérico causado por el grupo metilo.<sup>32</sup>

## 4.2 EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA

### 4.2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

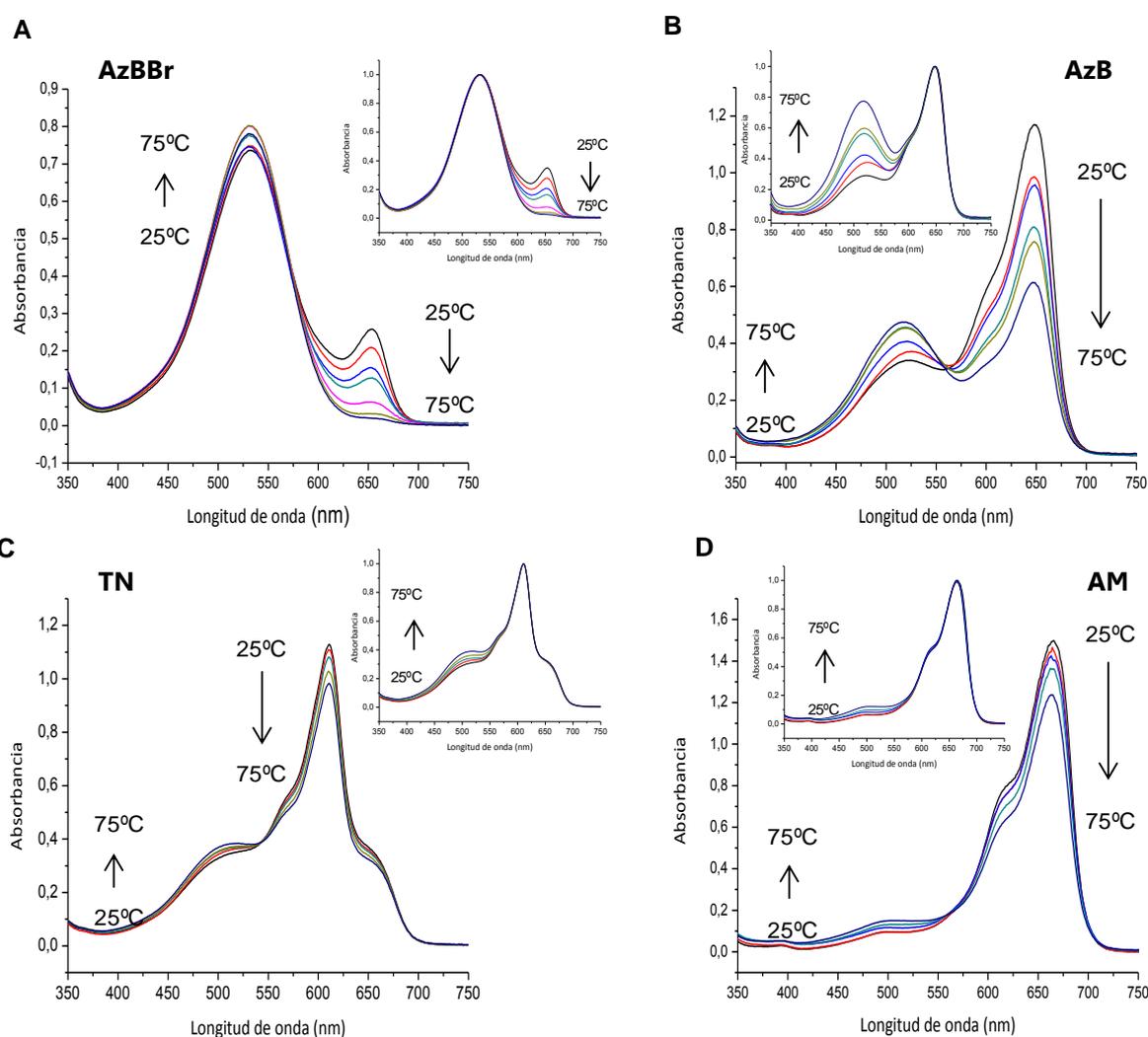
El comportamiento de agregación de AzB, AzBBr, TN y AM en función de la temperatura se evaluó por espectrofotometría UV-Visible. Las soluciones patrón de cada Fs (0,1 mg/mL) se prepararon en DMF y se diluyeron apropiadamente con el mismo solvente, para obtener tres soluciones en el rango de concentraciones de  $10^{-6}$  M -  $10^{-5}$  M. Diferentes alícuotas de 2 mL de cada solución, se colocaron en un baño termostático Haake F3-K durante 30 minutos, a distintas temperaturas (25 - 75°C). Finalmente, se analizaron por espectrofotometría UV-Visible en el rango de longitudes de onda de 350 nm a 750 nm, empleando un espectrofotómetro Evolution 300 (Thermo Scientific) y una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

### 4.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Uno de los factores que impacta en la agregación de los Fs es la temperatura. La forma monomérica de numerosos compuestos predomina sobre la forma dimérica, cuando se incrementa la temperatura del medio.<sup>63</sup> Con el fin de evaluar el equilibrio monómero-dímero de las cuatro tiazinas estudiadas, se analizó el efecto de la temperatura sobre la monomerización de estos compuestos utilizando DMF como solvente.

El principal objetivo de este estudio es analizar la especie monomérica de AM, la cual sólo se predijo en base a una disminución en los valores de absorbancia a aproximadamente 500 nm en función de la concentración del Fs (**Figura 19B**).

La **Figura 21** muestra las curvas espectrales obtenidas para todos los Fs en función de la temperatura. Un punto isobéptico se observó claramente a alrededor de 540 nm a 570 nm para todos los compuestos. Estos resultados confirman la existencia de dos especies en solución: monómeros (500 nm -550 nm) y dímeros (600 nm -650 nm). El incremento de la temperatura, evidenció una disminución de la forma dimérica y un aumento de la especie monomérica. Con el objetivo de resaltar este efecto, se analizaron las curvas espectrales normalizadas a la  $\lambda_{\max}$  de las especies dominantes para cada Fs (**Figura 21, insertos**). La forma dimérica de AzB, TN y AM es la principal especie en solución, en tanto que el monómero es la especie predominante para AzBBr.



**Figura 21:** Espectros de absorción de AzBBr (48  $\mu\text{M}$ -A), AzB (32  $\mu\text{M}$ -B), TN (18  $\mu\text{M}$ -C) y AM (25  $\mu\text{M}$ -D) en DMF en función de la temperatura. Inserto: espectros de absorción normalizados a la  $\lambda_{\max}$ .

Estos resultados demuestran que la monomerización causada por un aumento de la temperatura es significativa para el derivado monobromado. La agregación de este compuesto se inhibe completamente cuando la muestra alcanza los 75°C en todas las

concentraciones evaluadas. Por otra parte, las especies monoméricas de AzB y TN se evidenciaron claramente a las tres concentraciones de Fs evaluadas. Por último, la presencia del monómero correspondiente a AM se evidenció en mayor grado, con el aumento de la temperatura (**Figura 21D**), en comparación con las variaciones de concentraciones del Fs (**Figura 19B**). Estos resultados demuestran que la forma monomérica de AM presenta un máximo de absorción a alrededor de 500 nm comparable con los otras compuestos tiazínicos evaluados. La monomerización de AzBBr y AM, es mayormente afectada por las variaciones de la temperatura en comparación con los cambios en la concentración del Fs. Los agentes fototerapéuticos AzB y TN que evidenciaron un comportamiento similar frente a ambas variables.

Es importante resaltar que los ensayos de agregación en función de la temperatura se realizaron a tres concentraciones diferentes de cada Fs, mostrando en todos los casos la misma tendencia. Por esta razón y a modo de ejemplo se representaron los resultados correspondientes a una única concentración en la **Figura 21**.

Por otra parte, como etapa preliminar a los ensayos de agregación en función de la temperatura, se estudió la estabilidad térmica de todas las estructuras tiazínicas en las condiciones experimentales ensayadas.

En conclusión, las variación en la concentración de los Fs y los cambios en la temperatura demostraron que las especies monoméricas correspondientes a los compuestos tiazínicos presentan un máximo de absorción cercano a los 500 nm. Dicha especie, puede formar J-agregados con el incremento de la concentración del Fs y la disminución temperatura.

### **4.3. DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE DIMERIZACIÓN**

#### **4.3.1. MATERIALES Y MÉTODOS**

La constante de dimerización ( $K_d$ ) de los compuestos tiazínicos se determinó a partir de curvas experimentales en DMF utilizando el programa DECOM. Esta aplicación proporciona una herramienta convencional, fiable y fácil de usar para analizar el equilibrio monómero-dímero a partir de los resultados experimentales obtenidos por espectrofotometría UV-Visible.<sup>64</sup> El procesamiento de datos por DECOM consiste principalmente en dos etapas: la determinación de la constante de dimerización y la descomposición espectral. Una descripción detallada de la metodología y las aplicaciones de este programa han sido recientemente publicadas por sus autores.<sup>64,65</sup>

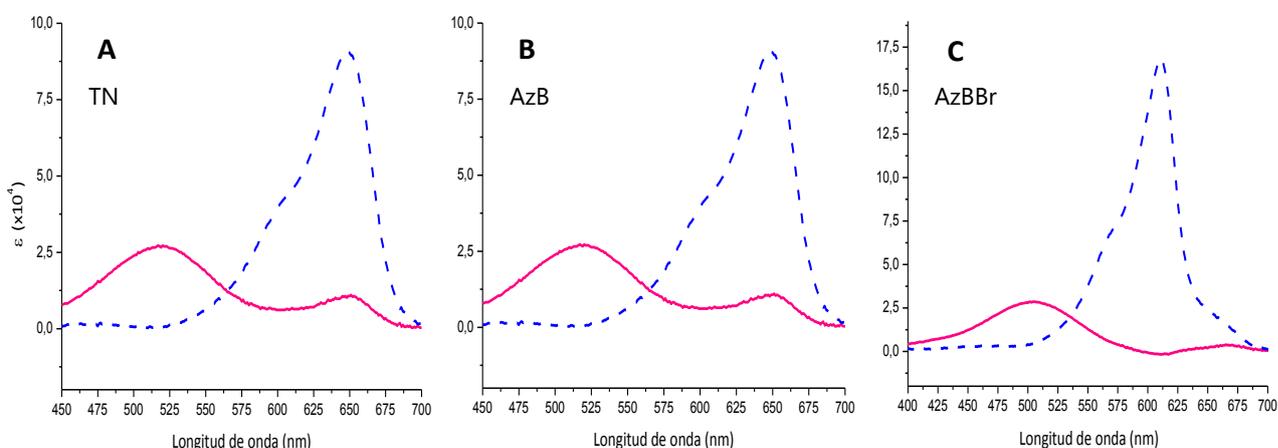
Los valores de  $K_d$  se calcularon aplicando el método de cuadrados mínimos con ajustes lineales y no lineales, analizando los datos espectrales obtenidos, para el intervalo de concentraciones de los Fs entre  $1 \times 10^{-6}$  M -  $1 \times 10^{-5}$  M.

#### 4.3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los valores de  $K_d$  obtenidos y la descomposición espectral de AzB, AzBBr y TN en DMF serán discutidos en esta Sección. Es importante destacar que, si bien el equilibrio monómero-dímero correspondiente a AM se evidenció en los ensayos realizados, la banda atribuible a la especie monomérica de este Fs no se definió claramente, por lo cual estos datos se excluyeron del análisis.

Los espectros de absorción calculados para las especies monoméricas y diméricas de TN, AzB y AzBBr se muestran en la **Figura 22**. Estos resultados corroboran el equilibrio monómero-dímero que se observó en las condiciones experimentales. Los espectros calculados para las especies monoméricas y diméricas evidenciaron curvas de absorción comparables a los datos experimentales.

La eficacia de los ajustes lineales y no lineales fueron aceptables y los valores de  $K_d$  obtenidos por ambos métodos fueron semejantes (**Tabla 5**). Estos resultados confirmaron que la dimerización de TN y AzB son similares, en tanto que el agente fototerapéutico AzBBr presentó menor tendencia a la dimerización. Además, la sustitución de un átomo de bromo en la estructura de AzB ocasionó un aumento en la  $\lambda_{\text{max}}$ , como así también en el coeficiente de absortividad molar ( $\epsilon$ ) de la especie monomérica y dimérica de este Fs. Este efecto es consecuencia de la inclusión de un sustituyente con pares de electrones libres (débilmente electronegativo) en una posición particular del sistema tiazínico (**Esquema 1**).



**Figura 22:** Espectros de absorción calculados en DMF para el monómero (rosa) y dímero (azul) correspondientes a TN (**A**), AzB (**B**) y AzBBr (**C**) en DMF.

**Tabla 5:** Resultados obtenidos del análisis del equilibrio de dimerización empleando DECOM.

Fs	Log $K_d$		$\epsilon_{\text{Monomer}}$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	$\epsilon_{\text{Dimer}}$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )
	Lineal	No lineal		
TN	4,35	4,65	$2,85 \times 10^4$ ( $\lambda=504$ nm)	$1,69 \times 10^5$ ( $\lambda=611$ nm)
AzB	4,50	4,80	$2,72 \times 10^4$ ( $\lambda=520$ nm)	$9,09 \times 10^4$ ( $\lambda=648$ nm)
AzBBr	4,02	4,05	$3,55 \times 10^4$ ( $\lambda=532$ nm)	$1,85 \times 10^5$ ( $\lambda=655$ nm)

La determinación de  $K_d$  permitió corroborar la tendencia de agregación establecida en base de los resultados experimentales obtenidos en DMF (Sección 4.1.2.4).

## 5. PRODUCCIÓN DE OXÍGENO SINGLETE

El principio de la TFD se sustenta en la capacidad de un Fs de generar  $^1O_2$  o diferentes ERO, a partir de su estado triplete excitado, tal como se desarrolló en la Sección 2, Capítulo 1. Estas especies reactivas son responsables de desencadenar alteraciones en diversas biomoléculas y promover así la muerte celular. Es importante destacar que el  $^1O_2$  se encuentra entre las especies reactivas de oxígeno más nocivas y es considerado el principal responsable del efecto biológico, ocasionado por esta modalidad terapéutica.<sup>66,67</sup>

El  $^1O_2$  es el primer estado electrónicamente excitado de oxígeno molecular. Debido a la disponibilidad del orbital  $\pi^* 2p$ , presenta alta reactividad química y desempeña un papel central en muchos procesos de fotooxidación biológicos y químicos. Esta especie es una de las principales con potencial daño para muchas biomoléculas tales como lípidos, proteínas y ADN, que pueden desencadenar la muerte celular.<sup>68,69</sup> Los lípidos, al ser alquenos que contienen hidrógenos alílicos, reaccionan produciendo hidroperóxidos lipídicos, principalmente de configuración trans, lo que puede generar severas consecuencias en las membranas celulares. Estos hidroperóxidos son inestables y pueden desencadenar reacciones de peroxidación en cadena. Por otra parte, esta ERO también puede reaccionar con moléculas que contienen nitrógeno o azufre, tales como algunos aminoácidos y bases nitrogenadas. Triptófano, tirosina, histidina, metionina, cisteína y cistina son los aminoácidos que se oxidan significativamente en presencia de  $^1O_2$  a pH fisiológico, dando origen a diferentes hidroperóxidos y endoperóxidos. En el caso de las bases nitrogenadas que conforman el ADN celular, la oxidación se produce principalmente en los sitios de desoxiguanosina, formando un endoperóxido en presencia de este agente oxidante.<sup>70</sup> En consecuencia, el estrés oxidativo generado por el

tratamiento fotodinámico puede alterar la permeabilidad de las membranas celulares; causar daños e inestabilidad genómica, disminuir la actividad catalítica de ciertas enzimas y generar proteínas más susceptibles a la degradación proteolítica. Estas alteraciones impactan en el metabolismo celular y pueden inducir a la muerte por apoptosis o necrosis.<sup>71</sup>

El  $\phi_{\Delta}$  es una medida cuantitativa de la eficiencia que presentan los Fs para utilizar la energía en forma de luz y convertir al oxígeno en el estado fundamental en  $^1\text{O}_2$ . La capacidad que tiene un Fs de generar ERO depende de numerosos factores. La agregación de estos compuestos en diferentes medios, puede afectar la reactividad de los mismos. Está demostrado que la formación de ensamblajes moleculares puede disminuir e inclusive producir la pérdida de la actividad fotodinámica de numerosos Fs.<sup>72,73</sup>

Diversas metodologías se han desarrollado, probado y aplicado en las últimas décadas para la determinación del  $\phi_{\Delta}$  correspondiente a diferentes Fs. La evaluación de luminiscencia de  $^1\text{O}_2$  es una metodología directa que permite la cuantificación del  $^1\text{O}_2$  generado, mediante la medición de la fosforescencia resuelta en el tiempo a 1270 nm. Si bien, la luminiscencia de esta especie es muy baja en la mayoría de los disolventes, el uso de detectores de alta sensibilidad permite la determinación, con gran precisión, de los  $\phi_{\Delta}$ . Sin embargo, estas evaluaciones resueltas en el tiempo requieren de equipos sofisticados y costosos. Por este motivo, numerosas mediciones indirectas son empleadas para la determinación de los  $\phi_{\Delta}$  de distintos Fs. Estos métodos se basan en el análisis cuantitativo de las reacciones de fotooxidación de diferentes sustratos durante el proceso de fotoexcitación del Fs. Los sustratos empleados son conocidos como atrapadores químicos del  $^1\text{O}_2$  por lo que reaccionan fácilmente en presencia de esta ERO, y su descomposición puede evaluarse mediante diferentes metodologías, tales como la espectrofotometría de absorción o fluorescencia. La disminución de la concentración del sustrato está directamente relacionada con la cantidad de  $^1\text{O}_2$  generado. Entre los compuestos más utilizados como atrapadores químicos del  $^1\text{O}_2$  se destacan: 1,3-diphenylisobenzofurano, triptófano, DMA, diferentes derivados ácidos, entre otros.<sup>74</sup>

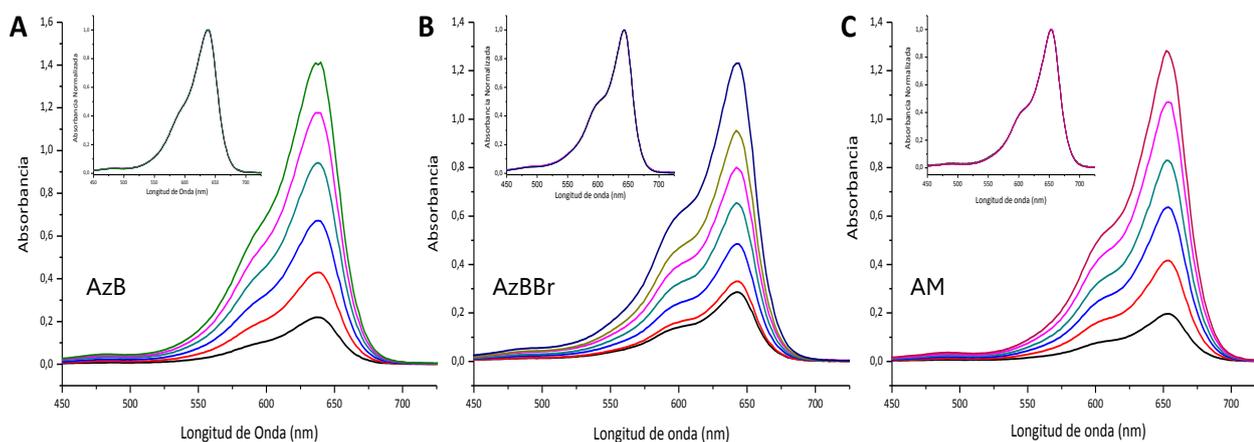
Se discutió en la Sección 4 de este Capítulo, que los estudios de agregación permitieron identificar a la especie monomérica de los Fs tiazínicos, como así también corroborar que las asignaciones realizadas en la literatura hasta el presente son erróneas. La especie descrita como monómero corresponde de manera inequívoca a la forma dimerica de los compuestos tiazínicos. Es importante destacar, que no se registran antecedentes relativos a las propiedades fotoquímicas de la forma monomérica de esta familia de Fs.

Con la finalidad de determinar la eficacia fotodinámica de la especie no agregada de AzB y su derivado monobromado como así también, analizar el efecto de la agregación en la producción de  $^1\text{O}_2$  de estos Fs, se evaluó el  $\phi_{\Delta}$  en diferentes disolventes empleando dos metodologías disponibles.

## 5.1. LUMINISCENCIA DEL OXÍGENO SINGLETE

### 5.1.1 MATERIALES Y MÉTODOS

Con el objetivo de determinar el  $\phi_{\Delta}$  de la especie monomérica de AzB y AzBBr, se prepararon soluciones de los Fs con valores de absorbancia cercanas a 0,15 a 532 nm en DMF, solvente que favoreció en mayor medida la monomerización de los compuestos tiazínicos (Sección 4.1.2.1). En estos ensayos, se empleó a RB como referencia, debido a que este Fs presenta máxima absorción a 562 nm, longitud de onda comparable a las correspondientes a los monómeros de las tiazinas evaluadas. Por otra parte, los  $\phi_{\Delta}$  de las formas diméricas de AzB y AzBBr, se evaluaron en metanol deuterado (MeOD), utilizando a AM como referencia.<sup>75</sup> El metanol (MeOH) estabiliza a la especie dimérica de los tres compuestos (**Figura 23**) y la deuteración del medio aumenta el tiempo de vida del  $^1\text{O}_2$ , posibilitando su detección.<sup>76</sup>



**Figura 23:** Agregación de AzB (A), AzBBr (B) y AM (C) en función de la concentración del Fs (3,3 – 20,8  $\mu\text{M}$ ) en MeOH.

Las soluciones de los tres agentes fototerapéuticos a evaluar se prepararon a una concentración tal que presentaran un valor de absorbancia cercano a 0,3 a la longitud de onda de excitación. Todas las muestras se irradiaron a 532 nm, con pulsos de 18 ns, utilizando un láser de Nd: YAG (Spectron Laser SL400). La luz emitida por el láser se filtró

apropiadamente, a fin de variar la energía de irradiación. La emisión fosforescente del  $^1\text{O}_2$  generado se detectó a 1270 nm con un detector de Ge amplificado (Judson J16/8SP) después de 4 - 6  $\mu\text{s}$  del impulso de láser. La salida del detector esta acoplada a un osciloscopio digital y a una computadora para el procesamiento de datos. Las señales de 10 pulsos de láser se promediaron y la traza obtenida se ajustó a una función monoexponencial de tiempo caracterizado por  $\tau_\Delta$ .

La representación gráfica de la intensidad de la fosforescencia de  $^1\text{O}_2$  a tiempo cero, para cada uno de los compuestos, en función de la energía de irradiación permitió determinar el  $\phi_\Delta$  se determinó mediante la comparación de las pendientes obtenidas para las formas monoméricas y diméricas de los Fs en estudio y los compuestos de referencia.

### 5.1.2. RESULTADO Y DISCUSIÓN

La generación total de  $^1\text{O}_2$  se evaluó mediante luminiscencia y los resultados obtenidos para las formas monoméricas y diméricas de AzB y AzBBr, como así también para las sustancias de referencias utilizadas, se muestran en la **tabla 6**. El Fs AzB presentó un resultado comparable a RB en DMF, mientras que el nuevo derivado monobromado superó en gran medida el  $\phi_\Delta$  de la referencia. Estos resultados demostraron que la especie monomérica de los Fs tiazínicos es buena productora de  $^1\text{O}_2$ .

**Tabla 6:** Rendimiento cuántico de oxígeno singlete ( $\phi_\Delta$ ).

Solvente	Fs	Luminiscencia del $^1\text{O}_2$			Fotooxidación de DMA		
		Especie <sup>b</sup>	Pendiente	$\phi_\Delta$	Especie <sup>b</sup>	Pendiente ( $\times 10^{-4}$ )	$\phi_\Delta$
DMF	AzB	M	0,36 $\pm$ 0,04	0,72	M-D	8,1 $\pm$ 0,1	0,29
	AzBBr	M	0,50 $\pm$ 0,02	1,0	M	2,45 $\pm$ 0,05	0,09
		-	-	-	M-D	21,5 $\pm$ 0,4	0,77
	RB	M	0,38 $\pm$ 0,02	0,76 <sup>c</sup>	M	20,9 $\pm$ 0,05	0,76 <sup>c</sup>
MeOH <sup>a</sup>	AzB	D	0,17 $\pm$ 0,02	0,35	D	8,56 $\pm$ 0,07	0,39
	AzBBr	D	0,37 $\pm$ 0,03	0,77	D	20,9 $\pm$ 0,2	0,93
	AM	D	0,24 $\pm$ 0,02	0,5 <sup>c</sup>	D	10,90 $\pm$ 0,08	0,5 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Solvente deuterado empleado en los ensayos de luminiscencia.

<sup>b</sup> Especies excitadas: Monómero (M); Dímero(D); Equilibrio Monómero-Dímero (M-D).

<sup>c</sup> Dato de literatura.<sup>75</sup>

Por otra parte, la especie dimérica de estos compuestos se evaluó en MeOD. Los agregados de AzB y AzBBr presentaron  $\phi_\Delta$  más bajos que sus respectivos monómeros (**tabla 6**). Investigaciones previas sostienen que la agregación reduce el tiempo de vida

del estado excitado de muchos Fs, probablemente por un incremento en la disipación de energía no radiativa del estado excitado, lo que conduce a una reducción en la generación de ERO y consecuentemente disminuyen el potencial terapéutico de estos compuestos.<sup>77</sup>

La comparación los resultados obtenidos en ambos medios, permite observar que la bromación incrementó significativamente la producción de  $^1\text{O}_2$  total. Este fenómeno se asocia con el conocido efecto del átomo pesado. La presencia de átomos con número atómico elevado facilita el cruce entre sistemas (ISC), dando origen al estado excitado triplete del Fs y favoreciendo la formación de ERO (Sección 2 del Capítulo 1).<sup>78,79</sup>

En conclusión, la especie monomérica de los compuestos tiazínicos presentó mayor  $\phi_{\Delta}$  que su correspondiente agregado, siendo el nuevo derivado monobromado el mejor productor de  $^1\text{O}_2$ , convirtiéndose en un buen candidato para la aplicación en TFD.

## 5.2. FOTOOXIDACIÓN DE 9,10 DIMETILANTRACENO

### 5.2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

Como metodología indirecta para determinar el  $\phi_{\Delta}$ , se evaluó la fotooxidación de 9,10 dimetilantraceno (DMA, Aldrich) ocasionada por el  $^1\text{O}_2$  reactivo generado por las especies monoméricas y diméricas de AzB y AzBBr.

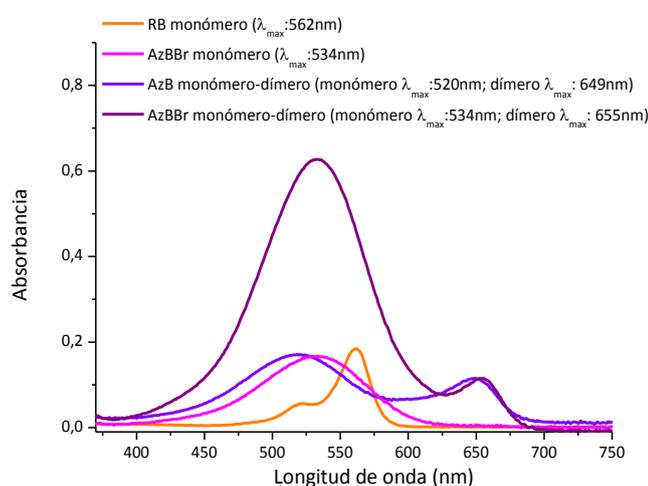
Diferentes soluciones de DMA (35  $\mu\text{M}$ ), en presencia y ausencia de los FS (absorbancia  $\approx$  0,1 ó 0,3), se prepararon en DMF y MeOH y posteriormente se irradiaron en una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico, durante 360 s, utilizando una lámpara de LED (Osram PARATHOM®, 5W; 8,4  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ). RB y AM se utilizaron como compuestos de referencia para la evaluación de las especies monoméricas y diméricas de los Fs tiazínicos, respectivamente. La cinética de descomposición de DMA se analizó a partir de la disminución de la absorbancia a 378 nm (máximo de absorción de este atrapador de  $^1\text{O}_2$ ), utilizando un espectrofotómetro UV-Visible Shimadzu UV-160.<sup>80,81</sup>

Las constantes de velocidad observadas ( $K_{\text{obs}}$ ) se determinaron mediante el ajuste lineal de la representación gráfica del  $\ln(A_0 / A_t)$  en función del tiempo de irradiación, donde  $A_0$  y  $A_t$  son los valores de absorbancia máxima de DMA a tiempo cero y a diferentes tiempos respectivamente. El  $\phi_{\Delta}$  de las especies monoméricas y diméricas de AzB y AzBBr se determinaron aplicando la **Ecuación 10**, donde  $\text{Abs}_0$  es la absorbancia inicial, de la referencia (Ref) o del Fs, a la  $\lambda_{\text{max}}$  de cada compuesto.<sup>82</sup>

$$\phi_{\Delta}^{Fs} = \frac{\phi_{\Delta}^{\text{Ref}} k_{\text{obs}}^{Fs} \text{Abs}_0^{\text{Ref}}}{k_{\text{obs}}^{\text{Ref}} \text{Abs}_0^{Fs}} \quad \text{Ecuación 10}$$

## 5.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La fotooxidación de DMA se aplicó para evaluar el  $\phi_{\Delta}$  reactivo de las formas monoméricas y diméricas de AzB y AzBBr. Este es un parámetro importante para el desarrollo de nuevos Fs, ya que es indicativo de la producción de  $^1\text{O}_2$  con capacidad de reaccionar químicamente con diferentes sustratos, lo que conduce a la destrucción de tejidos o células anormales.<sup>75,83</sup> Es importante resaltar que la excitación de los Fs se realizó con luz blanca, la cual puede excitar tanto a los monómeros como a los dímeros estudiados. Por este motivo, es necesario determinar las especies presentes en las condiciones experimentales, ya que todas pueden participar en la producción  $^1\text{O}_2$ . Como se muestra en la **Figura 24**, las formas monoméricas de AzBBr y RB presentaron valores de absorbancia cercanos a 0,15 en DMF, sin evidenciar la formación de agregados. Por otra parte, AzB presentó un equilibrio monómero-dímero en las mismas condiciones experimentales. Con el fin de evaluar el efecto de la presencia de dímero en la producción de  $^1\text{O}_2$ , se evaluó el  $\phi_{\Delta}$  de AzB y AzBBr en soluciones que presentaron valores de absorbancia cercana a 0,1 a la  $\lambda_{\text{max}}$  de la especie dimérica. En estas condiciones, ambos compuestos exhibieron equilibrio monómero-dímero.



**Figura 24:** Espectros de absorción de los Fs en DMF.

Es importante destacar que la descomposición de DMA fue dependiente del  $^1\text{O}_2$ , en las condiciones experimentales empleadas, debido a que no se evidenció degradación en ausencia de Fs. La producción del  $^1\text{O}_2$  reactivo generado por las diferentes especies de agregados se muestra en la **tabla 6**. En contraste con la producción total de  $^1\text{O}_2$  (ensayos de luminiscencia), la forma monomérica de AzBBr presentó el menor valor de  $\phi_{\Delta}$ . Sin

embargo, este Fs incrementó la producción de ERO cuando la especie dimérica estuvo presente en solución. Estos resultados ponen en evidencia que la presencia del dímero aumenta notablemente la producción de  $^1\text{O}_2$  reactivo, atribuible al compuesto AzBBr.

Con la finalidad de evaluar el  $\phi_{\Delta}$  de la forma dimérica de estos Fs, como única especie en solución, se determinó la fotooxidación de DMA en MeOH. Como era de esperar, el  $\phi_{\Delta}$  de la forma dimérica de AzBBr fue superior, que la correspondiente a la misma especie de su precursor. Además, el valor obtenido para el nuevo Fs superó la generación de  $^1\text{O}_2$  de AM, lo que sugiere que el agregado de AzBBr presenta buenos perfiles para su aplicación en TFD y TFDA.

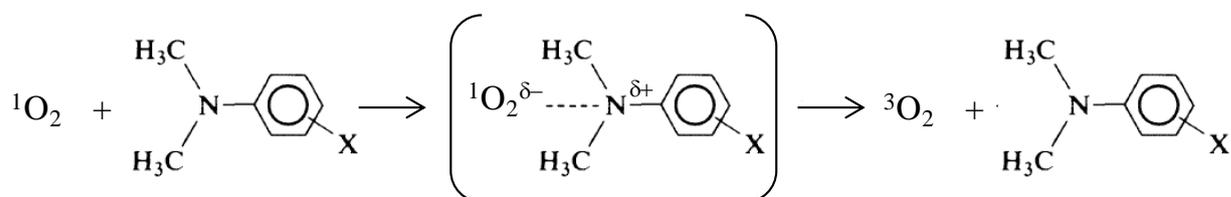
Los resultados obtenidos por ambas metodologías, demostraron que las formas diméricas de los Fs evaluados, presentan valores similares de  $\phi_{\Delta}$ . Esto significa que la totalidad del  $^1\text{O}_2$  generado es capaz de reaccionar con diferentes moléculas, desencadenando el efecto terapéutico deseado. Por otra parte, se observaron diferencias importantes en el  $\phi_{\Delta}$  total y reactivo de las especies monoméricas. Estas discrepancias podrían atribuirse a que la mayor parte del  $^1\text{O}_2$  generado, sufre una desactivación física rápida por interacción con la forma no agregada del Fs. Esta hipótesis se sustenta en que no se observaron cambios espectrales en las curvas de absorción de AzB y AzBBr, durante el ensayo de fotooxidación de DMA. Por lo tanto, las especies monoméricas de los compuestos tiazínicos podrían actuar como Fs y desactivantes del  $^1\text{O}_2$  simultáneamente, comportamiento que ha sido descrito por varios autores para diferentes sustratos.<sup>83-86</sup> Las interacciones intramoleculares que estabilizan a la especie dimérica, podrían inhibir o disminuir el efecto desactivante de AzB y AzBBr.

### 5.3. EFECTO DESACTIVANTE DEL OXIGENO SINGLETE

La interacción del  $^1\text{O}_2$  y un compuesto desactivante o *quencher*, conduce a la formación de un complejo excitado, denominado exciplejo, el cual se desactiva mediante diferentes procedimientos que implican transferencias de energía o reacciones químicas. El primer mecanismo se denomina desactivación física y se caracteriza por la pérdida de energía de una molécula excitada, a través de una interacción reversible con una molécula en el estado fundamental, sin generar nuevos productos de reacción. Por otra parte, la desactivación química involucra una reacción química entre el *quencher* y el  $^1\text{O}_2$ . Generalmente, la molécula desactivante se oxida dando origen a diferentes productos de degradación.<sup>87</sup>

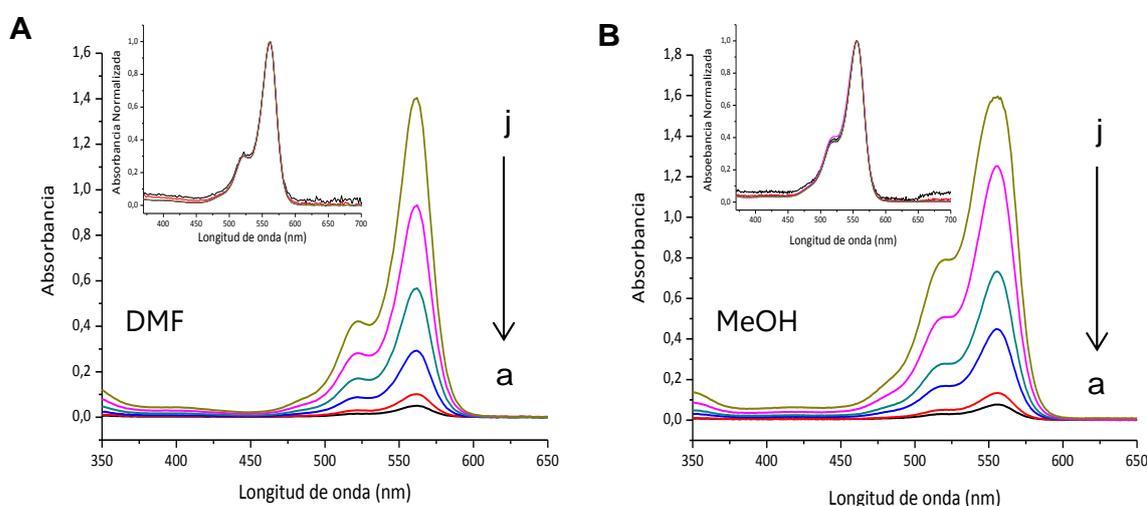
Numerosas publicaciones científicas demuestran que los derivados de N,N-dimetilanilina pueden actuar como desactivantes físicos mediante la formación de un exciplejo con el

$^1\text{O}_2$  (**Figura 25**).<sup>86,88-90</sup> Como se puede observar en el **Esquema 1** (Sección 4), los Fs tiazínicos presentan en sus estructuras químicas N,N-dimetilanilina, por lo tanto podrían comportarse como *quenchers* físicos. Por este motivo, se evaluó el efecto causado por la presencia de la especie monomérica y dimérica de AzBBr, en la producción de  $^1\text{O}_2$  del compuesto RB en DMF y MeOH, respectivamente.



**Figura 25:** Mecanismo de desactivación del  $^1\text{O}_2$ .

Como etapa previa a estos estudios, se corroboró que la especie monomérica de RB estuviera presente en ambos medios. Como se puede observar en la **Figura 26**, el monómero de RB es la única especie presente en soluciones de DMF y MeOH, presentando un máximo de absorción a 562 nm y 555 nm respectivamente.



**Figura 26:** Agregación de RB, en función de la concentración del Fs, en DMF (**A**) y MeOH (**B**). [RB] (a)  $9,8\mu\text{M}$  (j)  $29,5\text{ mM}$ . Inserto: espectros de absorción normalizados a la  $\lambda_{\text{max}}$  de RB.

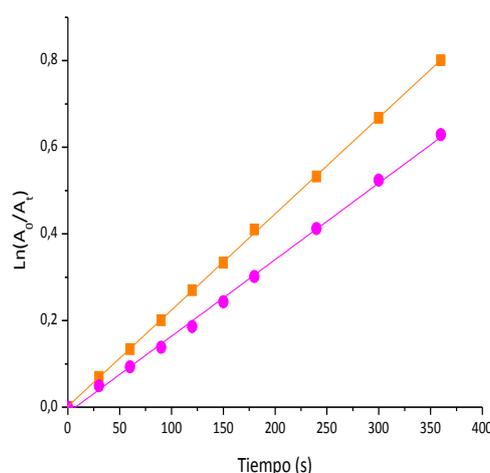
### 5.3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

Con el objetivo de evaluar el efecto desactivante de la especie monomérica y dimérica de AzBBr, se analizó la fotooxidación de DMA en diferentes solventes, utilizando a RB como generador de  $^1\text{O}_2$ .

El desarrollo de estos ensayos requirió la preparación de muestras de RB (absorbancia  $\approx 0,2$ ) y DMA ( $35 \mu\text{M}$ ) en presencia y ausencia de AzBBr (absorbancia  $\approx 0,1$ ). Las mismas se irradiaron durante 360 s utilizando una lámpara de LED (Osram PARATHOM®, 5W;  $8,4 \text{ mW/cm}^2$ ) y se analizaron a diferentes tiempos por espectrofotometría UV-Visible. Las curvas espectrales entre 200 y 800 nm se determinaron en un espectrofotómetro UV-Visible Shimadzu UV-160, empleando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. La cinética de descomposición DMA se analizó en función de la disminución de los valores de absorbancia a 378 nm (máximo de absorción de este atrapador de  $^1\text{O}_2$ ). Es importante resaltar, que los ensayos se realizaron por duplicado en DMF y MeOH, a fin de evaluar el efecto causado por la especie monomérica y dimérica de AzBBr respectivamente.

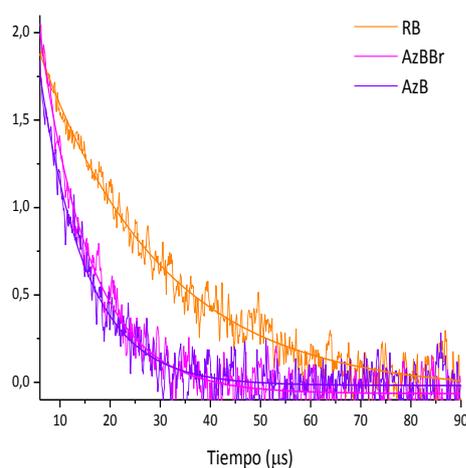
### 5.3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Figura 27** muestra la producción de  $^1\text{O}_2$  de RB como único componente y en presencia de la especie monomérica de AzBBr en DMF. Los valores de las pendientes obtenidas para ambas muestras son  $(2,22 \pm 0,01) \times 10^{-3}$  y  $(1,77 \pm 0,03) \times 10^{-3}$  respectivamente. Estos resultados indican que el  $\phi_\Delta$  disminuyó aproximadamente un 20% con la adición de la forma monomérica de AzBBr. En consecuencia, se puede afirmar que el monómero de este compuesto posee un importante efecto desactivante del  $^1\text{O}_2$ . Estos resultados son comparables con los presentados en la Sección 5.2, indicando que no se observaron cambios en las curvas espectrales correspondiente a AzBBr durante la irradiación, por lo cual el proceso de desactivación sería principalmente físico.



**Figura 27:**  $\phi_\Delta$  de RB como único componente (■) y en presencia del monómero de AzBBr (●) en DMF.

Los resultados obtenidos en estos ensayos, corroboran el análisis de los espectros de luminiscencia del  $^1\text{O}_2$  (Sección 5.1) en presencia de la especie monomérica de los diferentes Fs en DMF. Como se muestra en la **Figura 28**, el tiempo de vida de  $^1\text{O}_2$  es menor en presencia de las estructuras tiazínicas, en comparación con RB, lo que confirma la actividad desactivante de la especie monomérica de los compuestos AzB y AzBBr.

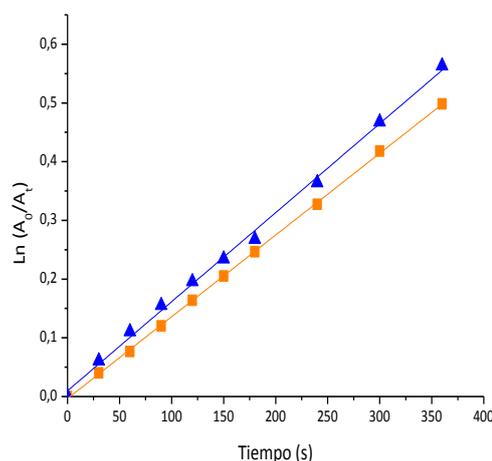


**Figura 28:** Luminiscencia del  $^1\text{O}_2$  en presencia de las especies monoméricas de los diferentes Fs

Con el objetivo de confirmar que la especie dimérica de los Fs tiazínicos no presentan actividad de *quencher*, se determinó el  $\phi_\Delta$  de RB, en ausencia y presencia de AzBBr, utilizando MeOH como solvente. La **Figura 29** pone en evidencia que la producción de  $^1\text{O}_2$  correspondientes a RB (pendiente =  $(1,39 \pm 0,01) \times 10^{-3}$ ) aumentó en presencia del agregado del Fs tiazínico (pendiente =  $(1,52 \pm 0,03) \times 10^{-3}$ ). Estos resultados confirman, que la forma monomérica de RB y dimérica de AzBBr, se comportan como productores de  $^1\text{O}_2$ . Es decir que el dímero del derivado monobromado no generó la desactivación de la ERO evaluada. Los espectros de fosforescencia del  $^1\text{O}_2$  determinados en MeOD en presencia de las especies diméricas de los compuestos AM, AzB, y AzBBr corroboraron estos resultados. Al comparar el tiempo de vida del  $^1\text{O}_2$  en estas muestras, no se observaron diferencias significativas, presentando valores cercanos a los 200  $\mu\text{s}$  en todos los casos.

El grupo N,N-dimetilanilina, presente en las estructuras tiazínicas, podría estar involucrado en las diferentes interacciones que estabilizan a los agregados, quedando menos disponible para la formación del excíplejo con el  $^1\text{O}_2$ , mediante el cual se produce la desactivación de la molécula excitada. Otros autores han demostrado que numerosos

factores pueden afectar las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de los Fs y que ciertos agregados moleculares presentan mayor producción de  $^1\text{O}_2$  que sus respectivos monómeros.<sup>91</sup> Los resultados obtenidos en estos estudios revelaron que la especie dimérica de los agentes fototerapéuticos AzB y AzBBr, son mejores candidatos para la aplicación en TFD y TFDA que sus respectivas formas monoméricas.



**Figura 29:**  $\phi_{\Delta}$  de RB como único componente (■) y en presencia del dímero de AzBBr (▲) en MeOH.

## 6. CONCLUSIONES

Los ensayos realizados permitieron evaluar diferentes propiedades de los Fs tiazínicos que podrían condicionar su acción terapéutica. Los resultados obtenidos brindaron información relevante a cerca del comportamiento de AzB y AzBBr en condiciones fisiológicas y durante el tratamiento fotodinámico, como así también permitieron seleccionar a la especie fotoquímicamente activa de estos compuestos.

Los valores de  $pK_a$  determinados demostraron que la forma catiónica de ambos Fs es la única especie en solución a los pH fisiológicos 1,2; 5,8 y 7,4. Considerando que los compuestos con carga positiva, presentan alta selectividad para el tratamiento fotodinámico de diferentes células cancerígenas, bacterias y hongos, podemos afirmar que AzB y AzBBr son buenos candidatos para su aplicación en TFD y TFDA.

Por otra parte, estos compuestos presentan alta estabilidad química en las condiciones experimentales evaluadas. Sin embargo, los estudios de fotoestabilidad, revelaron que la bromación incrementó la inestabilidad de los Fs. El  $t_{90}$  de AzB disminuyó un 68% por efecto de la halogenación. Estos valores permitirán definir la dosis de luz empleada en los estudios de actividad fotodinámica.

Los ensayos de agregación permitieron identificar a la especie monomérica de los Fs tiazínicos, que por décadas fueron asignadas erróneamente. Esta especie presentó un máximo de absorción entre 500 nm y 540 nm en los medios evaluados. El aumento de la concentración del Fs y la disminución de la temperatura favorecieron la formación de J-agregados, con máximo de absorción a longitudes de onda superiores a los 600 nm. En literatura, esta especie fue asignada incorrectamente a la forma monomérica de compuestos tiazínicos. Por otra parte, en soluciones acuosas, estos Fs presentaron un equilibrio entre los J-agregados (posibles dímeros) y agregados mayores. La incorporación de un átomo de bromo en la estructura de AzB desestabilizó el J-agregado, desplazando el equilibrio hacia la especie monomérica en solventes orgánicos, y hacia la formación de agregados mayores en solución acuosa. Además, se determinaron las constantes de dimerización y las tendencias de agregación correspondiente a los agentes fototerapéuticos AzB, AzBBr, TN y AM, en DMF y agua. Es importante destacar que este fenómeno tiene consecuencias fundamentales para la aplicación de los Fs en fotomedicina. Por esta razón, la correcta asignación de la especie, en diferentes soluciones, es relevante a fin de evaluar las propiedades fisicoquímicas, fotofísicas y biológicas de innumerables compuestos.

Finalmente, los estudios de producción de  $^1\text{O}_2$  demostraron que la especie monomérica de AzB y AzBBr tiene la capacidad de actuar simultáneamente como Fs y *quencher* físico. Por este motivo, solo parte del oxígeno singlete generado tiene la capacidad de reaccionar químicamente con moléculas del entorno.

Por otra parte, los  $\phi_{\Delta}$  total y reactivo de las especies diméricas son similares, lo que sugiere que la dimerización impide la formación del excíplejo que permite la desactivación física de esta ERO. Además, se corroboró que la bromación incrementó el  $\phi_{\Delta}$  de la especie monomérica y dimérica de AzB. A partir de estos resultados podemos concluir que la forma dimérica de AzBBr es la mejor productora de  $^1\text{O}_2$ , lo cual la convierte en un buen candidato para su aplicación en TFD y TFDA.

Una estrategia que permitiría incrementar la estabilidad fotoquímica de AzBBr, como así también estabilizar a la especie dimérica de este Fs en medios acuosos, sería su vehiculización en diferentes vectores, tales como nanopartículas, liposomas, micelas y dendrímeros, entre otros. Este sistema Fs-vehículo se conoce como Fs de tercera generación y es, actualmente, la principal herramienta utilizada para potenciar la eficacia y seguridad del tratamiento fotodinámico.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Delgado Cirilo A, Minguillón Llombart C, Joglar Tamargo J. Introducción a la química terapéutica. Segunda Ed. Ediciones Díaz de Santos: España, 2003.
- 2 Veber DF, Johnson SR, Cheng H, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of medicinal chemistry* 2002; 45: 2615–2623.
- 3 Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F, Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects. *Lasers in Medical Science* 2009; 24: 259–268.
- 4 Kempa M, Kozub P, Kimball J, Rojkiewicz M, Kus P, Gryczynski Z et al. Physicochemical properties of potential porphyrin photosensitizers for photodynamic therapy. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2015; 146: 249–254.
- 5 Ghalami-Chooabar B, Ghiami-Shomami A. Theoretical calculation of pKa values of the Nortryptiline and Amitryptiline drugs in aqueous and non-aqueous solvents. *Computational and Theoretical Chemistry* 2013; 1018: 66–70.
- 6 Shayesteh TH, Radmehr M, Khajavi F, Mahjub R. Application of chemometrics in determination of the acid dissociation constants (pKa) of several benzodiazepine derivatives as poorly soluble drugs in the presence of ionic surfactants. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015; 69: 44–50.
- 7 Dohoda D, Tsinman K, Tsinman O, Wang H, Tam KY. Spectrophotometric pKa determination of ionizable pharmaceuticals: Resolution of molecules with weak pH-dependent spectral shift. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2015; 114: 88–96.
- 8 Pandey MM, Jaipal A, Kumar A, Malik R, Charde SY. Determination of pKa of felodipine using UV-Visible spectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2013; 115: 887–890.
- 9 Neira JL, Rizzuti B, Iovanna JL. Determinants of the pKa values of ionizable residues in an intrinsically disordered protein. *Archives of biochemistry and biophysics* 2016; 598: 18–27.
- 10 Mills A, Hazafy D, Parkinson J, Tuttle T, Hutchings MG. Effect of alkali on methylene blue (C.I. Basic Blue 9) and other thiazine dyes. *Dyes and Pigments* 2011; 88: 149–155.
- 11 Da Silva JS, Junqueira HC, Ferreira TL. Effect of pH and dye concentration on the n-octanol/water distribution ratio of phenothiazine dyes: A microelectrode voltammetry study. *Electrochimica Acta* 2014; 144: e154–e160.
- 12 Muehlmann LA, Joanitti GA, Silva JR, Longo JPF, Azevedo RB. Liposomal photosensitizers: Potential platforms for anticancer photodynamic therapy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2011; 44: 729–737.
- 13 Oniszczyk A, Wojtunik-kulesza KA, Oniszczyk T, Kasprzak K. The potential of photodynamic therapy (PDT) — Experimental investigations and clinical use. 2016; 83: 912–929.

- 14 Beckham TH, Lu P, Jones EE, Marrison T, Lewis CS, Cheng JC et al. LCL124, a cationic analog of ceramide, selectively induces pancreatic cancer cell death by accumulating in mitochondria. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2013; 344: 167–78.
- 15 Sousa AS, Prates RA, de Santi MESO, Lopes RG, Bussadori SK, Ferreira LR et al. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* biofilm: Influence of the radiant energy and photosensitizer charge. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2016; 14: 111–114.
- 16 Longo JPF, Leal SC, Simioni AR, Almeida-Santos MFM, Tedesco AC, Azevedo RB. Photodynamic therapy disinfection of carious tissue mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in cationic liposomes: An in vitro and clinical study. *Lasers in Medical Science* 2012; 27: 575–584.
- 17 Nicotra VE, Mora MF, Iglesias RA, Baruzzi AM. Spectroscopic characterization of thionine species in different media. *Dyes and Pigments* 2008; 76: 315–318.
- 18 Goicoechea J, Arregui FJ, Corres JM, Matias IR. Study and Optimization of Self-Assembled Polymeric Multilayer Structures with Neutral Red for pH Sensing Applications. *Journal of Sensors* 2008; 2008: 1–7.
- 19 Petzer A, Harvey BH, Wegener G, Petzer JP. Azure B, a metabolite of methylene blue, is a high-potency, reversible inhibitor of monoamine oxidase. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2012; 258: 403–409.
- 20 Cincotta L, Foley JW, Cincotta AH. Novel red absorbing benzo[a]phenoxazinium and benzo[a]phenothiazinium photosensitizers: in vitro evaluation. *Photochemistry and photobiology* 1987; 46: 751–758.
- 21 Dandriyal J, Singla R, Kumar M, Jaitak V. Recent developments of C-4 substituted coumarin derivatives as anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2016; 119: 141–168.
- 22 International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products 2003.
- 23 Blessy M, Patel RD, Prajapati PN, Agrawal YK. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 2014; 4: 159–165.
- 24 Bajaj S, Sakhuja N, Singla D, Bajaj Principal S. Stability Testing of Pharmaceutical Products. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2012; 02: 129–138.
- 25 Handoko YA, Rondonuwu FS, Limantara L. The photosensitizer stabilities of Tookad® on aggregation, acidification, and day-light irradiation. *Procedia Chemistry* 2015; 14: 474–483.
- 26 Ferreira J, Menezes PFC, Kurachi C, Sibata C, Allison RR, Bagnato VS. Photostability of different chlorine photosensitizers. *Laser Physics Letters* 2008; 5: 156–161.
- 27 International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology 2005.

- 28 Quattrocchi OA, Abelaira S, Laba R. *Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica*. artes Gráficas Farro S.A.: Argentina, 1992.
- 29 Martínez SS, Uribe EV. Enhanced sonochemical degradation of azure B dye by the electroFenton process. *Ultrasonics Sonochemistry* 2012; 19: 174–178.
- 30 Luan J, Zhao W, Feng J, Cai H, Zheng Z, Pan B et al. Structural, photophysical and photocatalytic properties of novel Bi<sub>2</sub>AlVO<sub>7</sub>. *Journal of Hazardous Materials* 2009; 164: 781–789.
- 31 Bonnett R. *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*. Gordon and Breach Science Publishers: Amsterdam, 2000.
- 32 Chakraborty A, Ali M, Saha SK. Molecular interaction of organic dyes in bulk and confined media. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2010; 75: 1577–1583.
- 33 Würthner F, Kaiser TE, Saha-Möller CR. J-aggregates: From serendipitous discovery to supramolecular engineering of functional dye materials. *Angewandte Chemie - International Edition* 2011; 50: 3376–3410.
- 34 Antonov L, Gergov G, Petrov V, Kubista M, Nygren J. UV-Vis spectroscopic and chemometric study on the aggregation of ionic dyes in water. *Talanta* 1999; 49: 99–106.
- 35 Kostka M, Zimcik P, Miletin M, Klemnera P, Kopecky K, Musil Z. Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2006; 178: 16–25.
- 36 Valdes-Aguiler O, Neckers DC. Aggregation Phenomena in Xanthene Dyes. *Accounts Of Chemical Research* 1989; 22: 171–177.
- 37 Arik M, Onganer Y. Molecular excitons of Pyronin B and Pyronin Y in colloidal silica suspension. *Chemical Physics Letters* 2003; 375: 126–133.
- 38 Wainwright M. *Photosensitisers and Photosensitisation in Biomedicine*. John Wiley & Sons: Ltd, Chichester, UK, 2009.
- 39 Gilani AG, Salmanpour M, Ghorbanpour T. Solvatochromism, dichroism and excited state dipole moment of azure A and methylene blue. *Journal of Molecular Liquids* 2013; 179: 118–123.
- 40 Patil K, Pawar R, Talap P. Self-aggregation of Methylene Blue in aqueous medium and aqueous solutions of Bu<sub>4</sub>NBr and urea. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2000; 2: 4313–4317.
- 41 Adachi K, Mita T, Yamate T, Yamazaki S, Takechi H, Watarai H. Controllable adsorption and ideal H-aggregation behaviors of phenothiazine dyes on the tungsten oxide nanocolloid surface. *Langmuir* 2010; 26: 117–125.
- 42 Bergmann K, O’Konski CT. A spectroscopic study of Methylene Blue monomer, dimer, and complexes with montmorillonite. *The Journal of Physical Chemistry* 1963; 67: 2169–2177.
- 43 Heger D, Jirkovský J, Klán P. Aggregation of methylene blue in frozen aqueous solutions studied by absorption spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry A* 2005; 109: 6702–6709.

- 44 Yazdani O, Irandoust M, Ghasemi JB, Hooshmand S. Thermodynamic study of the dimerization equilibrium of methylene blue, methylene green and thiazole orange at various surfactant concentrations and different ionic strengths and in mixed solvents by spectral titration and chemometric analysis. *Dyes and Pigments* 2012; 92: 1031–1041.
- 45 Dakiky M, Nencova I. Aggregation of o,o'-dihydroxyazo dyes-1. Concentration, temperature, and solvent effect. *Dyes and Pigments* 1999; 40: 141–150.
- 46 Bayar Ş, Dinçer HA, Gonca E. The synthesis of some phthalocyanines derived from bulky substituted phthalonitriles. *Dyes and Pigments* 2009; 80: 156–162.
- 47 Monahan AR, Germano NJ, Blossey DF. The Aggregation of Arylazonaphthols. II. Steric. *J Phys Chem* 1971; 75: 1227–1233.
- 48 Virgilio A, Esposito V, Citarella G, Pepe A, Mayol L, Galeone A. The insertion of two 8-methyl-2'-deoxyguanosine residues in tetramolecular quadruplex structures: Trying to orientate the strands. *Nucleic Acids Research* 2012; 40: 461–475.
- 49 Brown WH, Foote CS, Inverson BL, Anslyn. E. *Organic Chemistry*. 5th ed. Cengage Learning.: Unite State, 2009.
- 50 Urrutia MN, Ortiz CS. Spectroscopic characterization and aggregation of azine compounds in different media. *Chemical Physics* 2013; 412: 41–50.
- 51 Laia CAT, Costa SMB. Solvatochromism and thermochromism of the electronic spectra of an indocarbocyanine dye. *Journal of Molecular Structure* 2001; 565-566: 83–86.
- 52 Rezende MC, Aracena A. Electrophilicity and solvatochromic reversal of pyridinium phenolate betaine dyes. *Chemical Physics Letters* 2012; 542: 147–152.
- 53 Kuriyan J, Konforti B, Wemmer DT. *The molecules of life: physical and chemical principles*. Garland Science: United State, 2013.
- 54 Cerón-Carrasco JP, Jacquemin D, Laurence C, Planchat A, Reichardt C, Sraïdi K. Solvent polarity scales: Determination of new ET(30) values for 84 organic solvents. *Journal of Physical Organic Chemistry* 2014; 27: 512–518.
- 55 Carey FA, Sundberg RJ. *Advanced organic chemistry. Part A: structure and mechanisms*. Fifth Edit. Springer: New York, 2007.
- 56 Isago H. *Optical spectral of phthalocyanines and related compounds. A guide for Beginners*. Springer: Japan, 2015.
- 57 Avakyan VG, Shapiro BI, Alfimov M V. Dimers, tetramers, and octamers of mono- and trimethyne thiocarbocyanine dyes. Structure, formation energy, and absorption band shifts. *Dyes and Pigments* 2014; 109: 21–33.
- 58 Monahan AR, Blossey DF. Aggregation of arylazonaphthols. I. Dimerization of Bonadur Red in aqueous and methanolic systems. 1970; 74: 4014–4021.
- 59 Chang CC, Yang YT, Yang JC, Wu H Da, Tsai T. Absorption and emission spectral shifts of rose bengal associated with DMPC liposomes. *Dyes and Pigments* 2008; 79: 170–175.
- 60 Wainwright M, Phoenix DA, Gaskell M, Marshall B. Photobactericidal activity of methylene blue derivatives against vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 1999; 44: 823–825.
- 61 Montes De Oca MN, Vara J, Milla L, Rivarola V, Ortiz CS. Physicochemical properties and

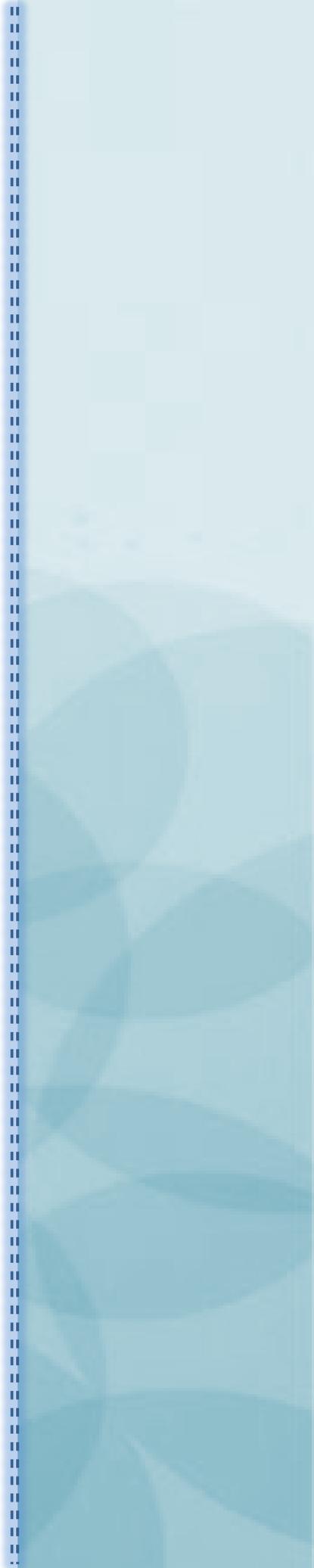
- photodynamic activity of novel derivatives of triarylmethane and thiazine. *Archiv der Pharmazie* 2013; 346: 255–265.
- 62 Horobin RW, Stockert JC, Rashid-Doubell F. Fluorescent cationic probes for nuclei of living cells: Why are they selective? A quantitative structure-activity relations analysis. *Histochemistry and Cell Biology* 2006; 126: 165–175.
- 63 Karimi Gofar M, Moradi K, Kor NM. Spectroscopic studies on aggregation phenomena of dyes. *European Journal of Experimental Biology* 2014; 4: 72–81.
- 64 Gilani AG, Moghadam M, Zakerhamidi MS. Dimeric spectra analysis in Microsoft Excel: A comparative study. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 2011; 104: 175–181.
- 65 Gilani AG, Shokri S. Spectral and aggregative properties of two oxazine dyes in aqueous solutions containing structure-breaking and multifunctional additives. *Journal of Molecular Liquids* 2014; 193: 194–203.
- 66 Ferreira DP, Conceição DS, Calhella RC, Sousa T, Socoteanu R, Ferreira ICFR et al. Porphyrin dye into biopolymeric chitosan films for localized photodynamic therapy of cancer. *Carbohydrate Polymers* 2016; 151: 160–171.
- 67 Yano S, Hirohara S, Obata M, Hagiya Y, Ogura S ichiro, Ikeda A et al. Current states and future views in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 2011; 12: 46–67.
- 68 Dumont E, Grüber R, Bignon E, Morell C, Moreau Y, Monari A et al. Probing the reactivity of singlet oxygen with purines. *Nucleic Acids Research* 2016; 44: 56–62.
- 69 Anquez F, Belkoura IEY, Suret P, Randoux S, Courtade E. Cell death induced by direct laser activation of singlet oxygen at 1270 nm. *Laser Physics* 2013; 23: 25601.
- 70 Bacellar IOL, Tsubone TM, Pavani C, Baptista MS. Photodynamic efficiency: From molecular photochemistry to cell death. *International Journal of Molecular Sciences* 2015; 16: 20523–20559.
- 71 Barrera G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN oncology* 2012; : Article ID 137289.
- 72 Yoon HK, Lou X, Chen YC, Koo Lee YE, Yoon E, Kopelman R. Nanophotosensitizers engineered to generate a tunable mix of reactive oxygen species, for optimizing photodynamic therapy, using a microfluidic device. *Chemistry of Materials* 2014; 26: 1592–1600.
- 73 Lim CK, Heo J, Shin S, Jeong K, Seo YH, Jang WD et al. Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of Cancer. *Cancer Letters* 2013; 334: 176–187.
- 74 Gerola AP, Semensato J, Pellosi DS, Batistela VR, Rabello BR, Hioka N et al. Chemical determination of singlet oxygen from photosensitizers illuminated with LED: New calculation methodology considering the influence of photobleaching. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2012; 232: 14–21.
- 75 DeRosa MC, Crutchley RJ. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews* 2002; 233-234: 351–371.
- 76 Barbieri Y, Massad WA, Díaz DJ, Sanz J, Amat-Guerri F, García NA. Photodegradation of bisphenol A and related compounds under natural-like conditions in the presence of

- riboflavin: Kinetics, mechanism and photoproducts. *Chemosphere* 2008; 73: 564–571.
- 77 Nyokong T. Effects of substituents on the photochemical and photophysical properties of main group metal phthalocyanines. *Coordination Chemistry Reviews* 2007; 251: 1707–1722.
- 78 Cui G, Fang WH. State-specific heavy-atom effect on intersystem crossing processes in 2-thiothymine: A potential photodynamic therapy photosensitizer. *Journal of Chemical Physics* 2013; 138: 044315.
- 79 Huang L, Cui X, Therrien B, Zhao J. Energy-funneling-based broadband visible-light-absorbing Bodipy-C 60 triads and tetrads as dual functional heavy-atom-free organic triplet photosensitizers for photocatalytic organic reactions. *Chemistry - A European Journal* 2013; 19: 17472–17482.
- 80 Alvarez MG, Montes de Oca MN, Milanesio ME, Ortiz CS, Durantini EN. Photodynamic properties and photoinactivation of *Candida albicans* mediated by brominated derivatives of triarylmethane and phenothiazinium dyes. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2014; 11: 148–155.
- 81 Ferreyra DD, Reynoso E, Cordero P, Spesia MB, Alvarez MG, Milanesio ME et al. Synthesis and properties of 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-N,N-dimethylaminopropoxy)phenyl] chlorin as potential broad-spectrum antimicrobial photosensitizers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2016; 158: 243–251.
- 82 Ge J, Lan M, Zhou B, Liu W, Guo L, Wang H et al. A graphene quantum dot photodynamic therapy agent with high singlet oxygen generation. *Nature Communications* 2014; 5: 4596.
- 83 Wang H, Wang S, Liu Z, Dong C, Yang J, Gong X et al. Upconverting crystal/dextran-g-DOPE with high fluorescence stability for simultaneous photodynamic therapy and cell imaging. *Nanotechnology* 2014; 25: 155103.
- 84 Soltermann AT, Luiz M, Biasutti MA, Carrascoso M, Amat-Guerri F, García NA. Monosubstituted naphthalenes as quenchers and generators of singlet molecular oxygen. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 1999; 129: 25–32.
- 85 Gambetta C, Natera J, Massad WA, García NA. Methyl anthranilate as generator and quencher of reactive oxygen species: A photochemical study. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2013; 269: 27–33.
- 86 Valencia C, Tobón E, Castaño C. Acetazolamide as a singlet molecular oxygen quencher. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2013; 251: 113–117.
- 87 Ramel F, Birtic S, Cuiné S, Triantaphylidès C, Ravanat J-L, Havaux M. Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants. *Plant physiology* 2012; 158: 1267–78.
- 88 Young RH, Brewer D, Kayser R. On the mechanism of quenching by amines: a new method for investigation of interactions with triplet states. *Canadian Journal of Chemistry* 1974; 52: 2889–2893.
- 89 Darmanyan AP, Jenks WS, Jardon P. Charge-Transfer Quenching of Singlet Oxygen  $O_2(1\Delta_g)$  by Amines and Aromatic Hydrocarbons. *The Journal of Physical Chemistry A* 1998; 102: 7420–7426.

- 90 Deepa HR, Thipperudrappa J, Suresh Kumar HM. A study on fluorescence quenching of LD-425 by aromatic amines in 1,4-dioxaneacetonitrile mixtures. *Journal of Luminescence* 2012; 132: 1382–1388.
- 91 Novakova V, Zimcik P, Kopecky K, Miletin M, Kuneš J, Lang K. Self-assembled azaphthalocyanine dimers with higher fluorescence and singlet oxygen quantum yields than the corresponding monomers. *European Journal of Organic Chemistry* 2008; : 3260–3263.

# **CAPÍTULO 4**

## **PREPARACIÓN DE FOTOSENSIBILIZADORES DE TERCERA GENERACIÓN**

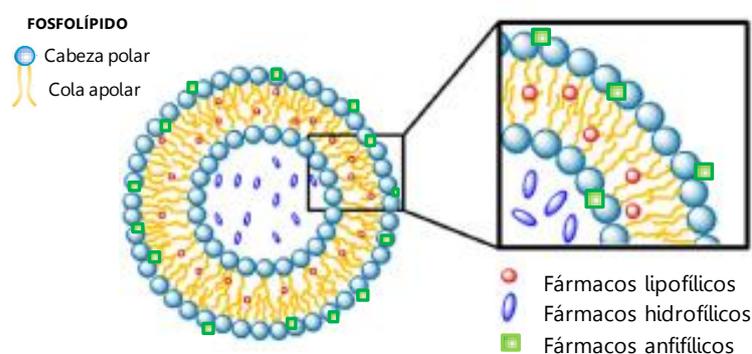


## 1. LIPOSOMAS EN LA VEHICULIZACIÓN DE FOTOSENSIBILIZADORES

El uso clínico de numerosos Fs de primera y segunda generación se ha visto obstaculizado por su daño no específico, hidrofobicidad y degradación biológica o fotoquímica, entre otras características. Con el objetivo de superar estas dificultades, diferentes estrategias de vehiculización han sido utilizadas, permitiendo la obtención de sistemas de liberación biodegradables, conocidos como Fs de tercera generación.<sup>1</sup>

Los liposomas son actualmente uno de los sistemas nanotransportadores de fármacos más utilizados en aplicaciones clínicas, y en particular son los vehículos más empleados en el tratamiento de diversas enfermedades oncológicas.<sup>2</sup> Esta estrategia es ampliamente investigada para su aplicación en TFD y TFDA por ser sistemas versátiles que presentan elevada biocompatibilidad y han demostrado un incremento de la concentración de diferentes Fs en el sitio de acción. Por otra parte evitan la degradación y agregación del agente fototerapéutico en medios biológicos, del mismo modo que reducen los efectos colaterales o adversos característicos de estas terapias.<sup>3-5</sup> Numerosos estudios científicos evidencian que el uso de liposomas en el desarrollo de Fs de tercera generación presentan mayores beneficios en comparación con otros sistemas de vectorización, tales como micelas y nanopartículas poliméricas o metálicas.<sup>6,7</sup>

Los sistemas liposomales son vesículas esféricas de naturaleza lipídica que consisten en una o varias bicapas, formadas principalmente por fosfolípidos naturales o sintéticos, que rodean a un compartimento acuoso. El carácter polar del núcleo liposomal permite encapsular fármacos hidrofílicos, en tanto que compuestos anfifílicos y lipofílicos interaccionan con la bicapa lipídica, en función de su afinidad por los fosfolípidos (**Figura 1**).<sup>8</sup>

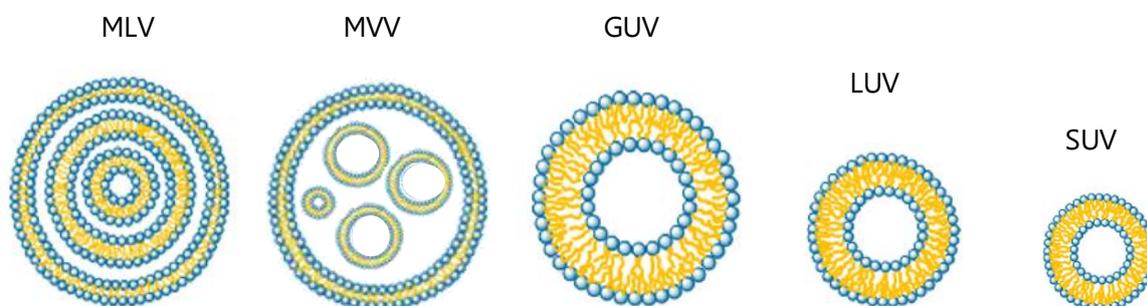


**Figura 1:** Estructura liposomal.

La gran variedad de liposomas existentes se clasifican según su tamaño, número de bicapas lipídicas que lo conforman (lamelaridad), como así también por su composición.

Estos parámetros impactan directamente a la eficacia de encapsulación del fármaco en los sistemas de vehiculización. Además, el tamaño de las vesículas liposomales tiene implicancia fundamental en la determinación de la vida media de circulación plasmática.<sup>9</sup> Considerando el tamaño y lamelaridad, los liposomas se clasifican en:

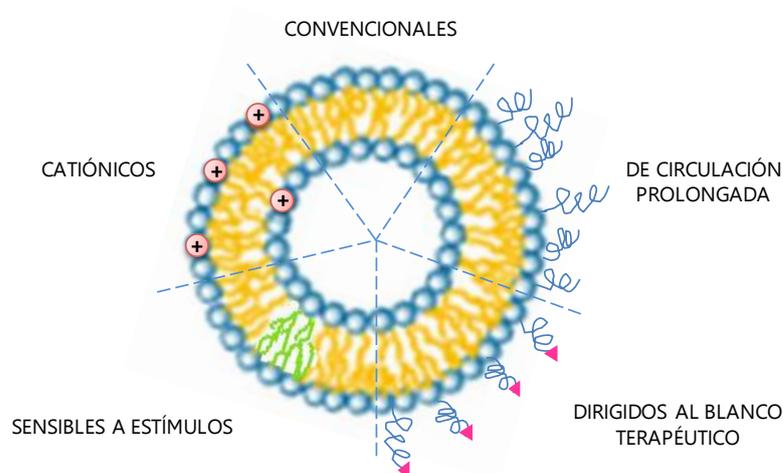
- Vesículas Multilamelares: formadas por numerosas bicapas lipídicas que pueden ubicarse en forma concéntrica, liposomas conocidos como multilamelares (MLV, siglas en inglés), o irregularmente dando origen a sistemas multivesiculares (MVV, siglas en inglés). Ambos vehículos se caracterizan por permitir una elevada encapsulación de fármacos lipofílicos, ser fáciles de preparar y mecánicamente estables durante su almacenamiento, si bien presentan un rápido aclaramiento plasmático (**Figura 2**).<sup>8,10</sup>
- Vesículas Unilamelares: presentan una única bicapa de fosfolípidos con un centro acuoso, por lo que son aplicadas para la vehiculización de compuestos hidrofílicos. Dependiendo de su tamaño pueden presentar diferente estabilidad química, física y biológica. Se definen vesículas unilamelares gigantes (>1  $\mu\text{m}$ ; GUV, siglas en inglés), grandes (0,1-10  $\mu\text{m}$ ; LUV, siglas en inglés) y pequeñas (<0,1  $\mu\text{m}$ ; SUV, siglas en inglés). (**Figura 2**).<sup>8,10,11</sup>



**Figura 2:** Clasificación liposomal según su tamaño y lamelaridad.

Los liposomas convencionales están compuestos por fosfolípidos neutros o aniónicos y pueden o no, contener colesterol. Estos sistemas varían ampliamente en sus propiedades fisicoquímicas tales como tamaño, composición lipídica, carga superficial, lamelaridad y fluidez de las bicapas de fosfolípidos que los conforman. Cuando se administran por vía intravenosa, estas vesículas se recubren rápidamente con proteínas plasmáticas, facilitando su fagocitosis por las células del sistema retículo-endotelial, lo que desencadena la rápida eliminación de la circulación sistémica.

Con el objetivo de incrementar la estabilidad biológica y mejorar la selectividad, la composición de los liposomas pueden modificarse mediante la incorporación de fosfolípidos con carga neta (vesículas catiónicas o aniónicas), la adición de cadenas de polietilenglicol en la cabeza polar de los lípidos (liposomas de circulación prolongada), como así también por la introducción de compuestos que reaccionan con la luz, la temperatura o cambios de pH, entre otros factores (sistemas sensibles a estímulos endógenos o exógenos). Finalmente, caben señalar a los liposomas dirigidos al blanco terapéutico, donde proteínas, péptidos, anticuerpos, hidratos de carbono y polímeros son unidos a los fosfolípidos o bien a las cadenas de polietilenglicol. La **Figura 3** esquematiza estos sistemas vesiculares.<sup>10,12,13</sup>



**Figura 3:** Clasificación de los liposomas según su composición.

Si bien los liposomas convencionales tienen la desventaja de ser eliminados rápidamente de la circulación sistémica, son estudiados y utilizados en numerosas aplicaciones terapéuticas. Formulaciones farmacéuticas de estos sistemas han sido aprobadas como Fs de tercera generación y presentan exitosos resultados en la TFD. Visudyne® y Foslip® son dos sistemas liposomales convencionales ampliamente estudiados para el tratamiento fotodinámico.<sup>14</sup> El primero de ellos, fue aprobado en el año 2000 por FDA y actualmente ANMAT ha aceptado su aplicación para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad. Visudyne® contiene verteporfina (como Fs), una porfirina semi-sintética derivada de la protoporfirina, vehiculizada en liposomas de dimiristoilfosfatidilcolina y fosfatidilglicerol de huevo (**Figura 4**).<sup>14,15</sup> Foslip® ha sido recientemente desarrollado y se encuentra en fases preclínicas. Diferentes estudios

demonstraron que esta formulación liposomal, compuesta por dipalmitoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilglicerol y temoporfina como agente terapéutico, es un Fs de tercera generación con eficacia prometedora, selectividad mejorada y efectos secundarios reducidos. Sin embargo, se requieren estudios más profundos para la optimización de la formulación a fin de lograr su aplicación clínica.<sup>14,16</sup>



**Figura 4:** Primer Fs de tercera generación aprobado por FDA y ANMAT.

Numerosos ensayos demostraron que las formulaciones liposomales presentan mayor eficiencia fotodinámica, menor daño en el tejido sano como así también, una disminución de la toxicidad en comparación con los Fs libres, en ausencia de luz.<sup>17,18</sup>

La actividad fotodinámica de AM, RB y RN en solución y encapsulados en liposomas convencionales fueron evaluadas frente a numerosas bacterias *Gram*-positivas y *Gram*-negativas. La eficacia de los Fs vehiculizados en vesículas de fosfatidilcolina y dipalmitoilfosfatidilcolina de huevo fue superior en comparación con los compuestos libres, en todas las células procariotas evaluadas.<sup>17</sup> Además, se ha demostrado que la incorporación de PpIX en liposomas de fosfatidilcolina, permite que el Fs se libere de un modo eficiente en las células cancerígenas HeLa, seguido de la redistribución a través del sistema de endomembranas, lo cual garantiza la máxima exposición de las estructuras celulares vitales, a la acción de las ERO generadas con la irradiación.<sup>18</sup> En conclusión, la encapsulación de diferentes Fs en liposomas multilamelares es una estrategia exitosa que permite incrementar la fotoinactivación de bacterias y células tumorales como así también, reducir la toxicidad en oscuridad y el daño al tejido sano.

El objetivo propuesto para esta etapa de la Tesis Doctoral fue encapsular los agentes fototerapéuticos, AzB y AzBBr, en sistemas liposomales, a fin de proteger dichos Fs del fenómeno de agregación e inestabilidad fotoquímica. Como se discutió en el Capítulo 3, la halogenación del compuesto AzB incrementó el  $\phi_{\Delta}$  de este compuesto pero, al mismo

tiempo, favoreció la formación agregados de orden superior en medios acuosos, con potencial disminución de la eficacia fotodinámica. La bromación también aceleró el proceso de degradación fotoquímica de este derivado, lo que limita la dosis de luz a utilizar en el tratamiento fotodinámico. La vehiculización de este Fs en sistemas liposomales es una interesante estrategia que apunta a estabilizar la especie activa del derivado tiazínico en condiciones fisiológicas y mejorar sus propiedades como agente fototerapéutico.

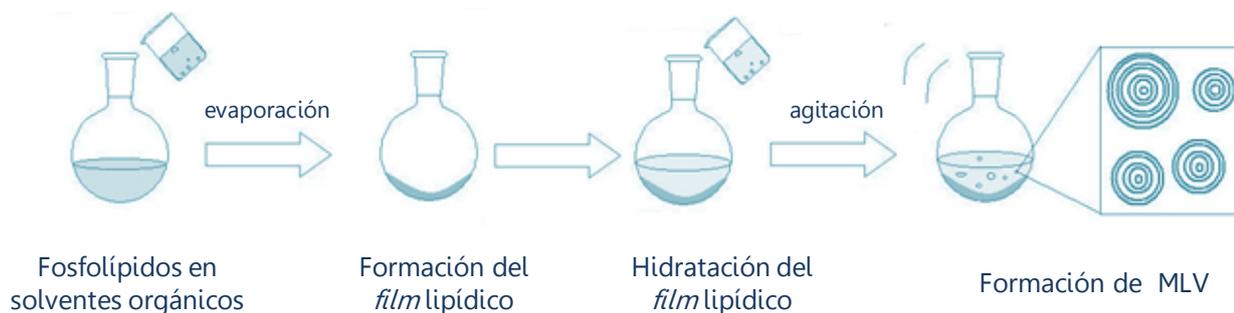
## 2. PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS

La selección del sistema vesicular para la vehiculización de los agentes fototerapéuticos AzB y AzBBr, se sustenta en las características estructurales de los compuestos tiazínicos como así también, en las propiedades de los diferentes liposomas. Es importante destacar que esta familia de Fs se caracteriza por ser compuestos aromáticos tricíclicos catiónicos, y en consonancia con lo expuesto en la Sección anterior, las sustancias lipofílicas y anfifílicas son confinadas principalmente en las bicapas lipídicas. Por este motivo, se seleccionaron las MLV, las cuales podrían proporcionar mayores rendimientos en la encapsulación de los Fs, AzB y AzBBr.

Una de las técnicas más utilizadas y sencillas para la preparación de MLV es la hidratación del *film* lipídico o método Bangham. Este procedimiento consiste en la disolución de los fosfolípidos en diferentes solventes orgánicos, tales como diclorometano, cloroformo, EtOH y mezcla cloroformo-MeOH en distintas proporciones. Una película de lípido delgada y homogénea, conocida como *film* lipídico, se forma mediante la evaporación del disolvente. Finalmente, agua destilada, *buffer* fosfato ó solución salina normal se utilizan en la hidratación del *film* generado. Con posterioridad a la agitación vigorosa de esta muestra se obtiene una dispersión de MLV de diferentes tamaños (**Figura 5**).<sup>19</sup> Cabe destacar que la temperatura es un parámetro importante que debe controlarse durante la hidratación y la formación de los liposomas, dependiendo en gran medida de la temperatura de transición de la fase gel a la líquido-cristalina ( $T_m$ ) de los fosfolípidos involucrados.

Con la finalidad de seleccionar el sistema de vectorización óptimo para los agentes fototerapéuticos AzB y AzBBr se evaluaron 2 fosfolípidos para la preparación de diferentes MLV. Dipalmitoil-fosfatidilcolina (dpPC, siglas en inglés –  $T_m$ : 41,5 °C), es un fosfolípido sintético, muy utilizado en formulaciones farmacéuticas y ampliamente investigado en el desarrollo de Fs de tercera generación. Por otra parte, fosfatidilcolina de huevo (EPC, siglas en inglés –  $T_m$ : -15 °C), es un compuesto de origen natural que ha

demostrado conformar uno de los sistemas más eficientes en la encapsulación del compuesto AM, Fs de estructura semejante a los abordados en el desarrollo de esta Tesis Doctoral.<sup>17</sup>



**Figura 5:** Método Bangham para la preparación de MLV.

## 2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

Las MLV se prepararon aplicando el método de hidratación del *film* lipídico, empleando EPC y dpPC. El procedimiento involucra la disolución de 1 mg de cada lípido en 200  $\mu$ L de solución cloroformo/MeOH (2:1 v/v). Posteriormente, los disolventes se evaporan bajo una corriente de nitrógeno con rotación constante, a fin de depositar una película uniforme en la parte inferior del tubo de Khan que contiene la muestra lipídica. Las trazas de solvente se eliminan colocando el *film* lipídico en un desecador con vacío constante durante 2 h. La película formada se hidrata con el agregado de 1 mL de solución reguladora de pH 7,4 y se agita vigorosamente en un Vortexmixer Speed Knob a una temperatura superior a la de transición de fase gel-líquido cristalino de los lípidos, procedimiento que permitió obtener las MLV.

Los fosfolípidos (Avanti Polar Lipids) se utilizaron sin purificación adicional. Los solventes orgánicos (Sintorgan), empleados en la formación del *film* lipídico, fueron de grado pro análisis y la solución reguladora de pH 7,4 se preparó acorde a las especificaciones que se detalla en la Sección 2.1 del Capítulo 3, ajustando la fuerza iónica a 0,15 M con el agregado de cloruro de sodio.

Con el objetivo de corroborar la formación de los sistemas vesiculares, se determinó el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad (IP) a 25 °C, utilizando un analizador de partículas Beckman Coulter Delsa Nano-C, (Beckman Coulter, Inc.) provisto de un láser de He-Ne (633 nm). La función de autocorrelación de la intensidad fue medida a un ángulo de 165° asumiendo un valor de viscosidad de 0,8878 Pa y un índice de refracción de 1,3328. Las muestras se diluyeron apropiadamente con agua ultrapura como etapa previa al análisis, realizando un mínimo de tres mediciones para cada determinación.

## 2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ensayos de dispersión dinámica de luz o *dynamic light scattering* (DLS) confirmaron la formación de los sistemas vesiculares. El tamaño de partícula como así también, el IP determinados para las MLV de EPC y dpPC se muestran en la **Tabla 1**.

**Tabla 1:** Evaluación de los liposomas preparados con diferentes fosfolípidos.

FOSFOLÍPIDO	TAMAÑO ( $\mu\text{m}$ )	IP
EPC	0,95	0,34
dpPC	1,2	0,31

Ambos sistemas liposomales presentaron un tamaño de partícula cercano a 1  $\mu\text{m}$  y valores de IP similares. Conociendo que las MLV presentan un tamaño entre 0,5  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$ <sup>19</sup> y, considerando que el método empleado para la preparación de estos sistemas conduce generalmente a la formación de liposomas multilamelares heterogéneos, con un diámetro promedio de 1-5  $\mu\text{m}$ ,<sup>20</sup> podemos afirmar que las vesículas lipídicas desarrolladas con EPC y dpPC presentaron tamaño de partícula e IP óptimos.

## 3. SELECCIÓN DEL FOSFOLÍPIDO: ESTUDIO DE AGREGACIÓN DE LOS FOTOSENSIBILIZADORES EN LIPOSOMAS

Numerosos autores han demostrado que la selección de fosfolípidos es una etapa fundamental del diseño, que afecta la capacidad de carga del fármaco como así también, su acumulación en el tejido blanco.<sup>18,21</sup> Diferentes características de estos sistemas vesiculares, tales como el volumen acuoso, la rigidez de la bicapa lipídica y sus propiedades superficiales, pueden influir en la eficacia de encapsulación (EE) de diversos ingredientes farmacéuticos activos. El grado de insaturación de la cadena carbonada de los fosfolípidos modifica el grado de empaquetamiento molecular y la curvatura de la membrana. Consecuentemente, afecta la vehiculización de compuestos lipofílicos y anfifílicos.<sup>21</sup> Por otra parte, los grupos funcionales que conforman la cabeza polar de los fosfolípidos determinan las propiedades superficiales de los liposomas y están involucrados en diferentes interacciones electrostáticas que intervienen en la encapsulación de fármacos.<sup>22</sup>

Con el objetivo de seleccionar las MLV óptimas para la vehiculización de los agentes fototerapéuticos AzB y AzBBr, se evaluó el efecto de la encapsulación de estos compuestos en vesículas de EPC y dpPC sobre la agregación de los Fs, como fenómeno relacionado a la interacción Fs-liposoma. Numerosos antecedentes demuestran que la incorporación de compuestos en diferentes sistemas de vectorización, disminuye la agregación.

### 3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

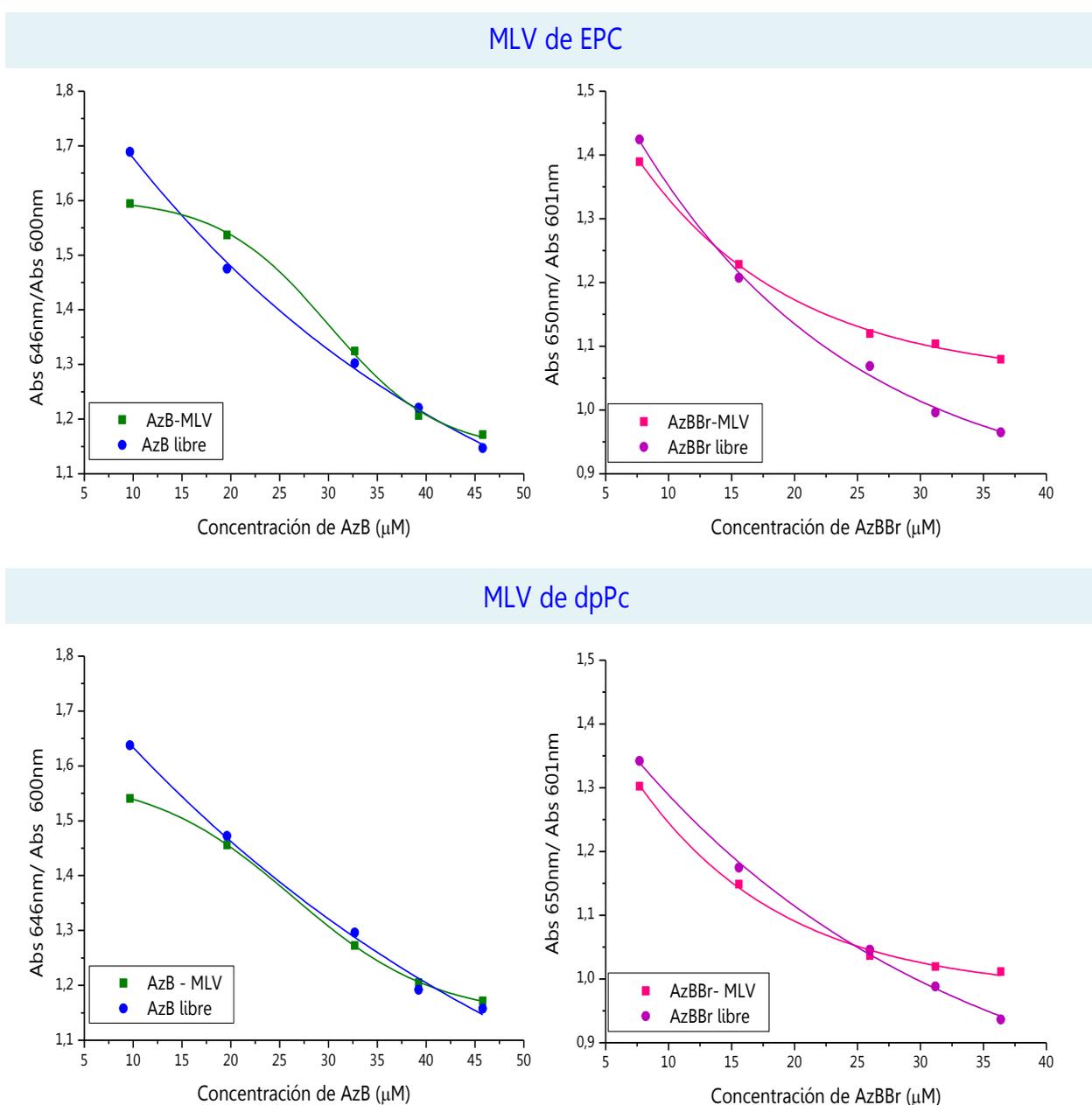
Las MLV se prepararon considerando la metodología descrita en la Sección 2.1. e incorporando diferentes concentraciones de los compuestos AzB o AzBBr, en la mezcla cloroformo/MeOH utilizada para la disolución de los fosfolípidos. La concentración final de EPC y dpPC en las muestras evaluadas fue de 1 mg/mL y la correspondiente al Fs se modificó entre 5-45  $\mu\text{M}$ .

Los liposomas resultantes se analizaron por espectrofotometría UV-Visible, entre 200 nm y 800 nm, a temperatura ambiente, utilizando un espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies) y una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Las curvas obtenidas permitieron determinar la relación de absorbancia entre la especie dimerica ( $\lambda_{max}^{AzB}$ : 646 nm;  $\lambda_{max}^{AzBBr}$ : 650 nm) y los agregados superiores ( $\lambda_{max}^{AzB}$ : 600 nm;  $\lambda_{max}^{AzBBr}$ : 601 nm) correspondientes a cada agente fototerapéutico. Los datos calculados se compararon con los obtenidos para los Fs, AzB y AzBBr, libres en solución reguladora de pH 7,4. El procedimiento empleado para la evaluación de la agregación fue descrito por Zeballos y colaboradores.<sup>23</sup> Los resultados obtenidos se procesaron con el programa OriginPro 8 SR0.

### 3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

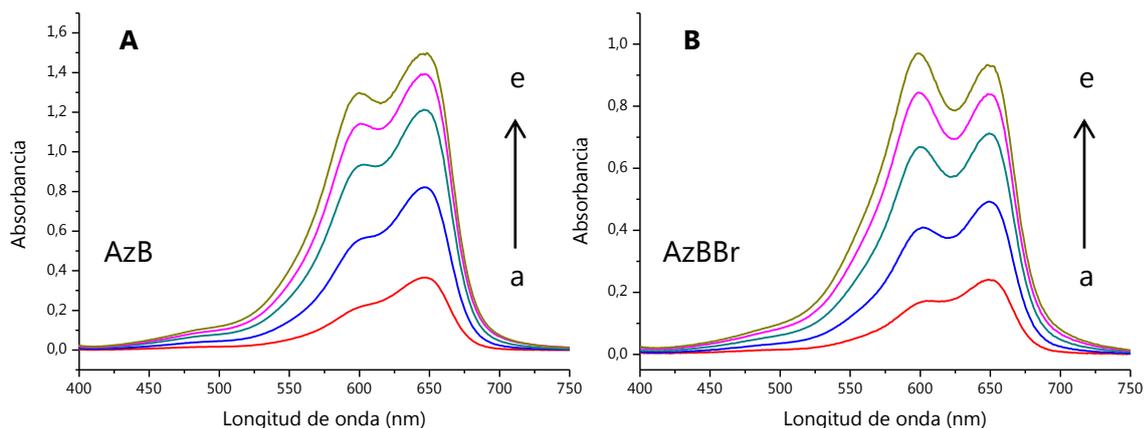
Las representaciones gráficas de relación de la absorbancia (dímero/agregado de orden superior) en función de la concentración del Fs se muestran en la **Figura 6** para los compuestos AzB y AzBBr libres como así también, encapsulados en MLV de EPC y dpPC. Los valores más elevados de esta relación indican un predominio de la forma dimerica sobre los agregados de orden superior (menor agregación) y estabilización de la especie activa de estos compuestos (dímeros). Como se puede observar, el comportamiento de agregación del Fs AzB libre en solución y vehiculizado en los liposomas presentan distintos perfiles (sigmoideal/exponencial), si bien no se evidencian diferencias significativas en el grado de agregación considerando el rango de concentraciones evaluadas. En contraste, el derivado monobromado presentó un decaimiento

exponencial para el Fs libre en solución y vehiculizado en las MLV, evidenciando importantes diferencias a las concentraciones más elevadas del compuesto. Las formulaciones liposomales disminuyeron la agregación de AzBBr, Fs que en medio acuoso evidenció mayor tendencia a la formación de agregados superiores que su precursor tiazínico (**Figura 6**). Por otra parte, si comparamos los resultados obtenidos para el derivado AzBBr en presencia de las vesículas de EPC y dpPC, podemos observar que las primeras inhiben en mayor medida la agregación, lo que se traduce en un incremento en la relación de absorbancia (dímero/agregado de orden superior). Este comportamiento pone en evidencia que el agente monobromado presenta mayor tendencia a particionar en los liposomas de EPC en comparación con los de dpPC.



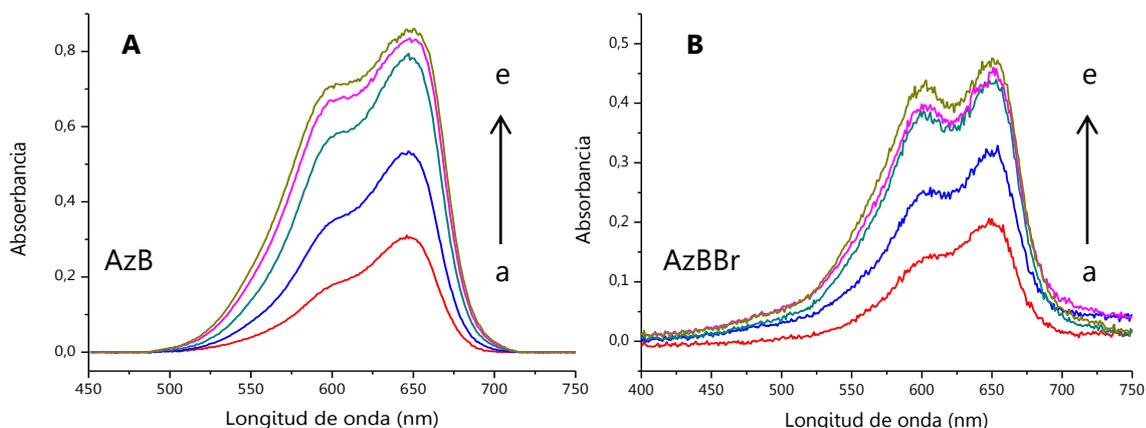
**Figura 6:** Estudio de agregación de Fs tiazínicos libres y encapsulados en MLV de EPC y dpPC.

Al análisis de la tendencia de agregación de los compuestos AzB y AzBBr, es importante adicionar la comparación de las curvas espectrales registradas para las formas libres (**Figura 7**) y encapsuladas en liposomas (**Figura 8**). Se observa claramente una disminución cercana al 50 % en los valores de absorbancia para las determinaciones realizadas en presencia de las MLV, para ambos ensayos realizados a las mismas concentraciones de los Fs.



**Figura 7:** Espectros de absorción de AzB (**A**) y AzBBr (**B**) en solución reguladora de pH 7,4 en función de la concentración de los Fs. [AzB] (a) 9,7; (e) 45,8  $\mu\text{M}$ . [AzBBr] (a) 7,7; (b) 36,4  $\mu\text{M}$ .

Esta significativa disminución podría atribuirse a una inestabilidad de los Fs en presencia de los fosfolípidos, a la dispersión de la luz generada por las MLV o bien a la detección incompleta por espectrofotometría UV-Visible del sistema Fs-liposoma. Cada una de estas alternativas se estudió para liposomas de EPC y los resultados obtenidos se presentan a continuación. Es importante destacar que se seleccionó este sistema vesicular ya que presentó mayor interacción con las tiazinas evaluadas.



**Figura 8:** Espectros de absorción de AzB (**A**) y AzBBr (**B**) encapsulados en MLV de EPC en función de la concentración de los Fs. [AzB] (a) 9,7; (e) 45,8  $\mu\text{M}$ . [AzBBr] (a) 7,7; (e) 36,4  $\mu\text{M}$ .

## 4. ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LOS FOTOSENSIBILIZADORES EN LIPOSOMAS MULTILAMELARES

Con el objetivo de estudiar la estabilidad química de los agentes fototerapéuticos AzB y AzBBr en presencia de los liposomas de EPC, se seleccionó un detergente (DT) para provocar la desorganización de las MLV (micelización), efecto que disminuyen la dispersión de la luz y permite cuantificar al Fs. Por lo tanto, se evaluó, por espectrofotometría UV-Visible y espectrofluorometría, el comportamiento de los compuestos tiazínicos en presencia de un DT catiónico, aniónico y neutro. La estabilidad de los Fs, AzB y AzBBr, se evaluó mediante la determinación del porcentaje de recuperación correspondiente a cada uno de ellos, con posterioridad a la disrupción liposomal.

### 4.1 SELECCIÓN DEL DETERGENTE

Altas concentraciones de los DT ocasionan la desestabilización de las membranas lipídicas que conforman los liposomas dando origen a micelas mixtas. Estos nuevos sistemas representan una pseudo-fase hidrofóbica que puede interactuar con los solutos y afectar sus propiedades de excitación y emisión.<sup>24</sup> Por esta razón, se evaluó el efecto de diferentes DT, a concentraciones superiores a la correspondiente concentración micelar crítica, en el comportamiento espectral de los Fs.

#### 4.1.1. MATERIALES Y MÉTODOS

Los espectros de absorción y fluorescencia de los compuestos AzB y AzBBr se registraron a diferentes concentraciones de Fs (1,5-30  $\mu\text{M}$ ) en solución reguladora de pH 7,4. Los resultados obtenidos se compararon con los correspondientes a las mismas preparaciones en presencia de tres DT (35 mM). De esta manera, se evaluó el efecto de dodecilsulfato de sodio (SDS, siglas en inglés; DT aniónico), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB, siglas en inglés; DT catiónico) y Tritón X-100 (DT neutro) sobre las propiedades fotofísicas de los Fs. Es importante destacar que no pudieron realizarse determinaciones en presencia de SDS por la formación de abundante precipitado.

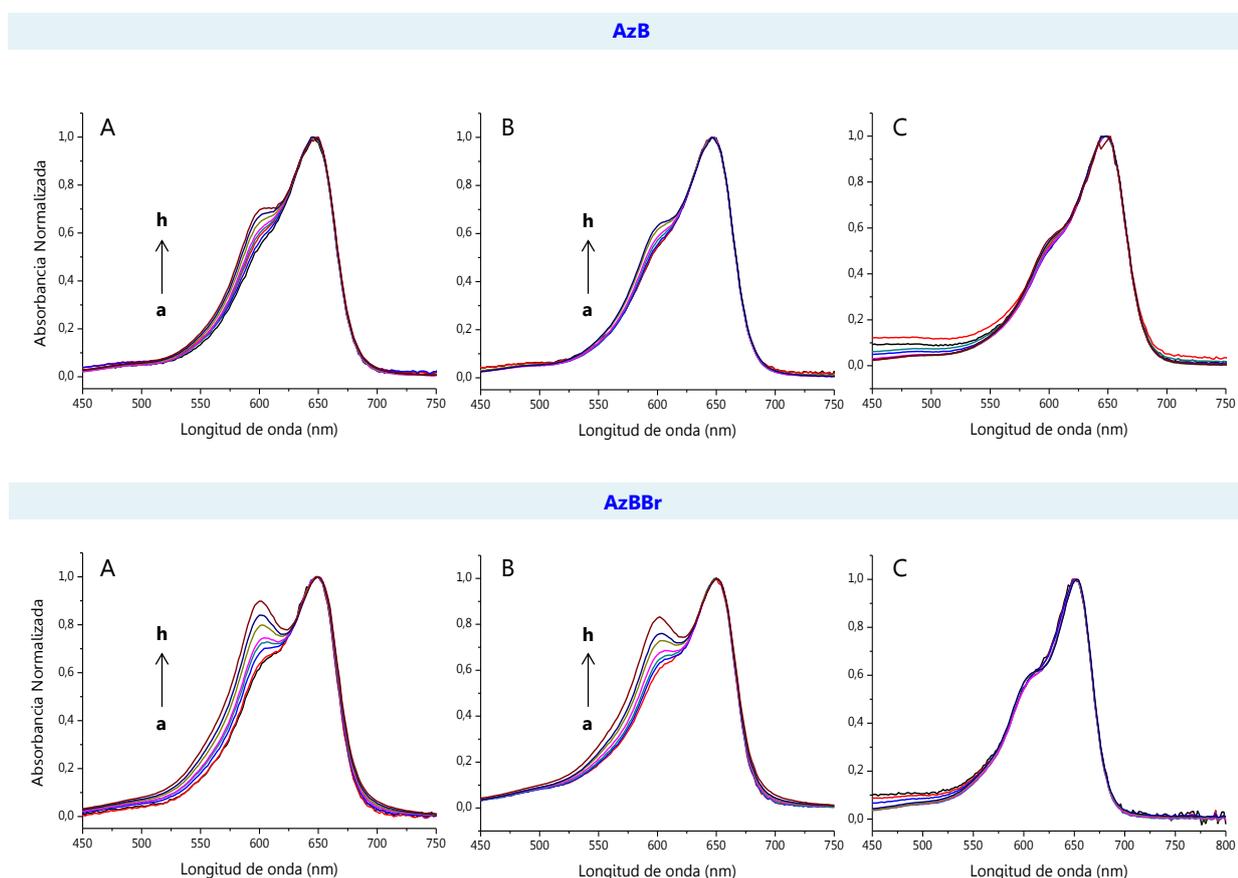
Los espectros de absorción se determinaron entre 200 nm y 800 nm, a temperatura ambiente, en un espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies), utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Los espectros de fluorescencia se registraron en un espectrofluorímetro Spex Fluoromax-3 Jovin Yvon (Horiba) equipado con celda termostaticada, lámpara de arco de xenón y arreglo de diodos como detector de señal, siendo la intensidad de fluorescencia (IF) registrada por un sistema contador de

fotones entre 660 nm y 850 nm. Las longitudes de onda de excitación ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) seleccionadas en estos ensayos fueron las  $\lambda_{\text{max}}$  correspondientes a la especie dimérica de los Fs (646 nm y 650 nm para AzB y AzBBr respectivamente). Es importante destacar que los agregados superiores de estos compuestos ( $\lambda_{\text{max}} \sim 600$  nm) no emiten fluorescencia.

La solución reguladora de pH 7,4 se preparó como se detalla en la Sección 2.1, Capítulo 3, ajustando la fuerza iónica a 0,15 M con cloruro de sodio y los resultados obtenidos por duplicado se procesaron con el programa OriginPro 8 SR0.

#### 4.1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los espectros de absorción obtenidos para los agentes fototerapéuticos AzB y AzBBr, determinados en ausencia y presencia de los diferentes DT, se muestran en la **Figura 9**.



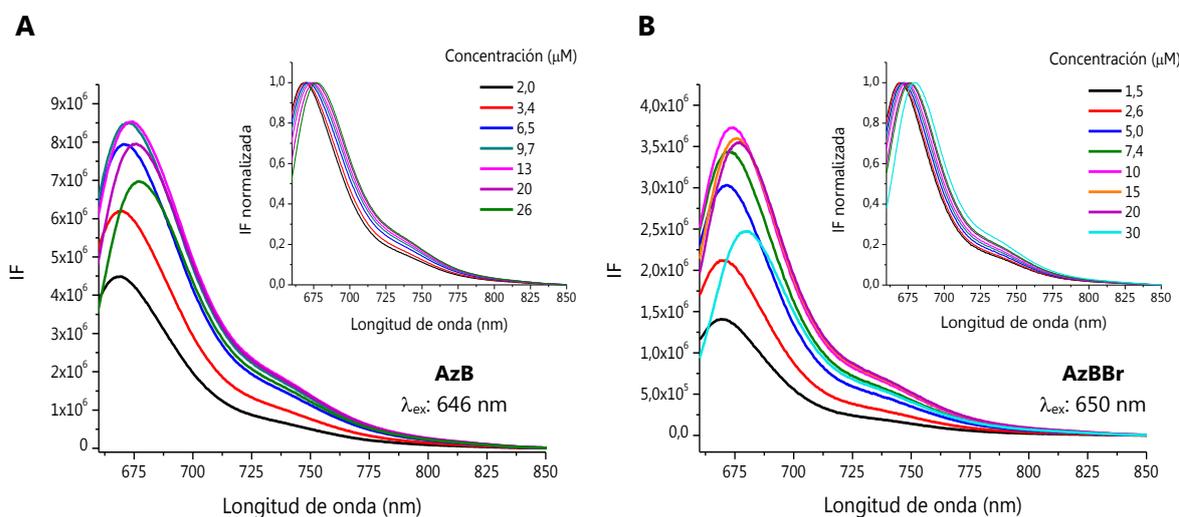
**Figura 9:** Espectros de absorción normalizada a la  $\lambda_{\text{max}}$  de los compuestos AzB y AzBBr en solución reguladora de pH 7,4: (A) sin DT y en presencia de (B) CTAB y (C) Tritón X-100.

[Fs]: (a) 1,5  $\mu\text{M}$ ; (h) 30  $\mu\text{M}$ .

Como se discutió en el Capítulo 3 (Sección 4), soluciones acuosas de los Fs, AzB y AzBBr, evidenciaron un equilibrio entre diferentes agregados. La presencia de los DT disminuyó la tendencia a la agregación de estos Fs. Particularmente, Tritón X-100 estabilizó a la

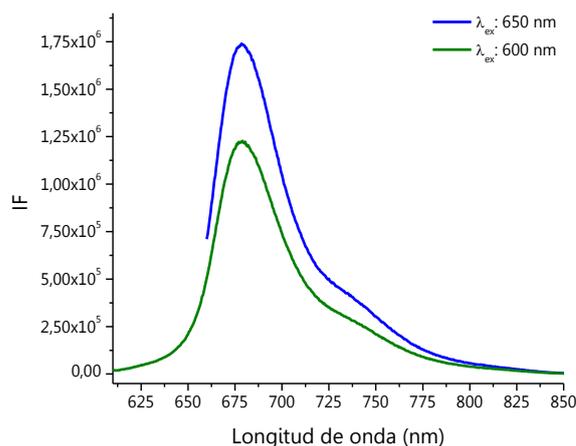
especie activa de los agentes fototerapéuticos (dímeros), inhibiendo completamente la formación de agregados superiores.

Al analizar los espectros de emisión de los analitos AzB y AzBBr en función de la concentración del Fs tiazínico, se observó que la IF aumenta, con el incremento de la concentración de estos compuestos hasta aproximadamente 10  $\mu\text{M}$ . Las muestras de mayor concentración presentaron disminución de la fluorescencia (**Figura 10**). Además, como se puede observar en las curvas normalizadas a la longitud de onda de máxima emisión ( $\lambda_{\text{em}}$  - **Figura 10, inserto**), el incremento de la concentración de los Fs, produjo un desplazamiento batocrómico de las curvas espectrales. Este comportamiento ha sido analizado previamente por otros autores, para Fs pertenecientes a la familia de las ftalocianinas, atribuyéndolo a un efecto de reabsorción de la fluorescencia, el cual no estaría relacionado con la formación de agregados.<sup>25</sup>



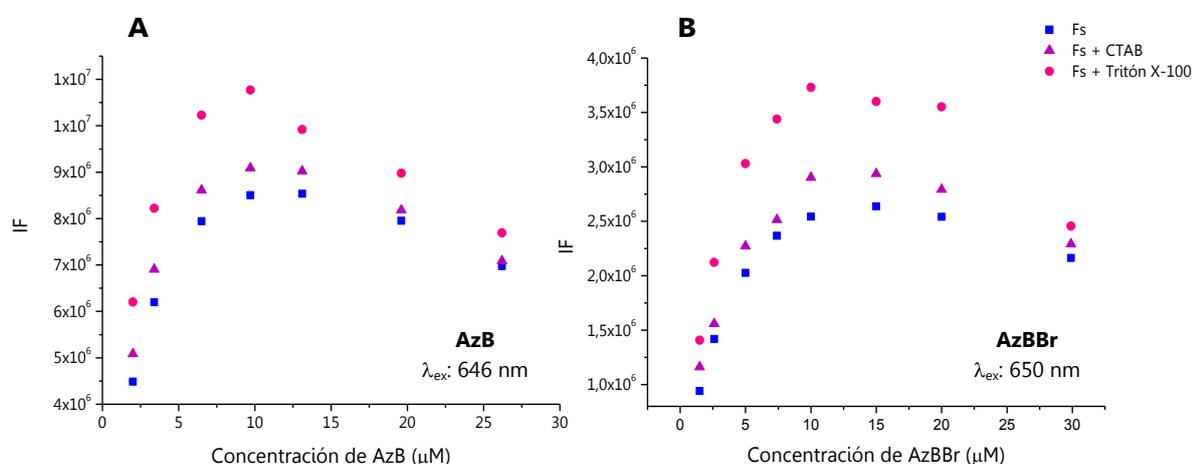
**Figura 10:** Espectros de fluorescencia de AzB (**A**) y AzBBr (**B**) en función de la concentración de Fs en solución reguladora de pH 7,4. **Inserto:** Curvas normalizadas a la  $\lambda_{\text{em}}$ .

Con el objetivo de determinar el comportamiento de fluorescencia de la especie dimerica y de los agregados mayores, presentes en las soluciones evaluadas, se determinaron los espectros de emisión del derivado AzBBr, excitando a la longitud de onda de máxima absorción de cada especie ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{dímero}}$ : 650 nm;  $\lambda_{\text{max}}^{\text{Agregado superior}}$ : 600 nm). Como se puede observar en la **Figura 11**, ambos espectros presentan diferentes IF y una única banda de emisión a 679 nm. El dímero (J-agregado) de este compuesto, también absorbe a 600nm pudiendo ser excitado a esta longitud de onda. Estos resultados demuestran que el agregado de orden superior no fluoresce y que las bandas de emisión obtenidas corresponden a la especie dimerica.



**Figura 11:** Espectros de fluorescencia del compuesto AzBBr en solución reguladora de pH 7,4; excitado a la  $\lambda_{max}$  de la especie dimérica (650 nm) y del agregado de orden superior (600 nm).

En base a los resultados obtenidos, es posible evaluar el efecto de la agregación de los agentes fototerapéuticos AzB y AzBBr, comparando las IF correspondientes a las muestras que presentan la misma concentración de los Fs en presencia y ausencia de diferentes DT. Un incremento en la IF indica un aumento en la proporción de la especie dimérica en el medio y consecuentemente una disminución en la proporción de los agregados de orden superior. La **Figura 12**, muestra los estudios por fluorescencia, que corroboran los resultados obtenidos por espectrofotometría UV-Visible. Los DT afectan el fenómeno de agregación de los compuestos AzB y su derivado monobromado, siendo Tritón X-100 el que presenta mayor efecto en la estabilización de la especie dimérica. Un análisis comparable lo realizaron previamente Camur y colaboradores, quienes demostraron, mediante un estudio detallado de los espectros de absorción y fluorescencia, que este DT disminuye la agregación de diferentes ftalocianinas en soluciones acuosas.<sup>26</sup>



**Figura 12:** IF en función de la concentración de (A) AzB y (B) AzBBr en solución reguladora de pH 7,4; en ausencia y presencia de diferentes DT.

Los resultados obtenidos mediante la aplicación de ambas metodologías, permite seleccionar a Tritón X-100 para la desestabilización de las MLV y posterior cuantificación de los Fs. Este DT inhibió la formación de agregados de orden superior para los compuestos AzB y AzBBr en medio acuoso, estabilizando la especie dimérica, sin ocasionar otras modificaciones en las curvas espectrales.

## 4.2. ENSAYO DE ESTABILIDAD

### 4.2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

Los liposomas multilamelares de EPC se prepararon en base a la metodología descrita en la Sección 2.1. de este Capítulo. Los Fs se incorporaron a la mezcla cloroformo/MeOH utilizada para la disolución de los fosfolípidos. La concentración final de EPC y Fs fue de 1 mg/mL y 40  $\mu$ M, respectivamente.

Las MLV que contienen a los agentes fototerapéuticos AzB y AzBBr, como así también los Fs libres en solución se analizaron por espectrofotometría UV-Visible, antes y después del agregado de Tritón X-100 (35 mM). El porcentaje de recuperación (PR) de los Fs, con posterioridad a la disrupción de los liposomas, se determinó aplicando la **Ecuación 1**.

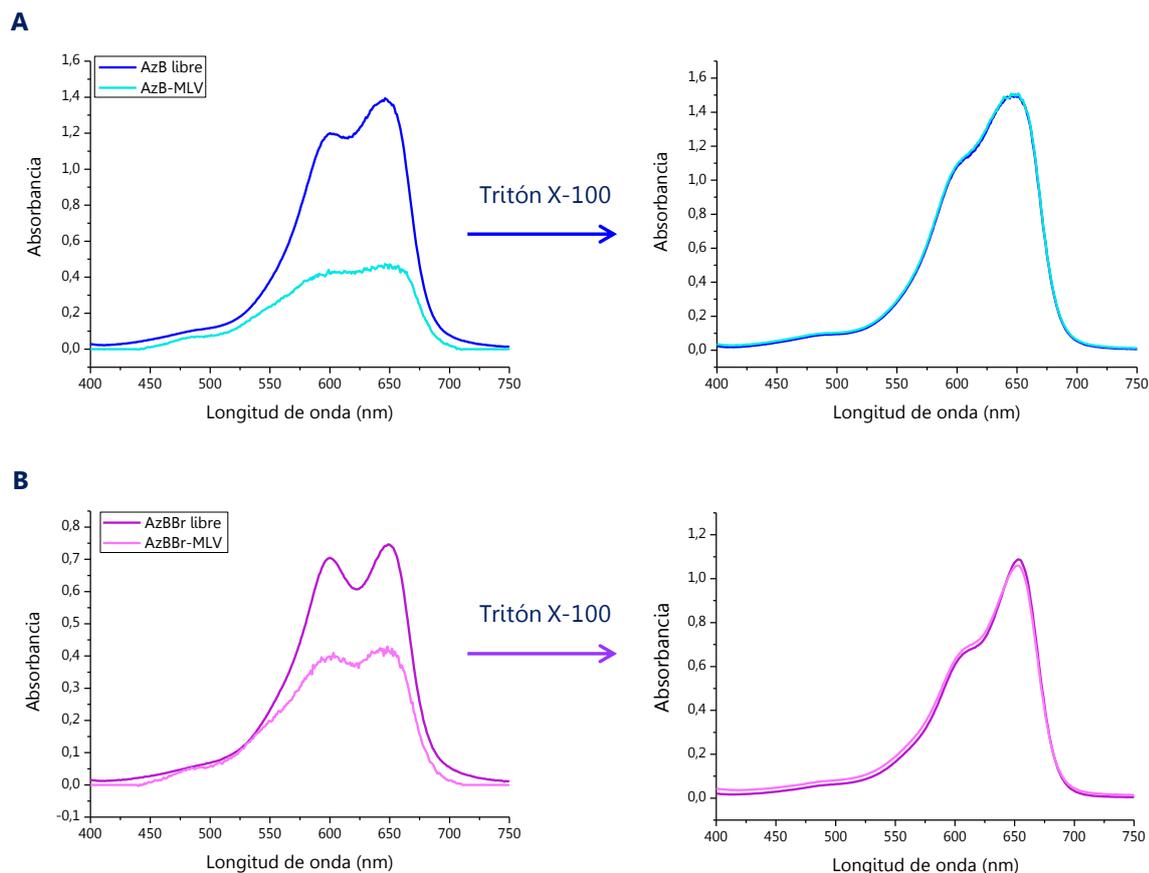
$$PR (\%) = \frac{Abs_{Fs+MLV+Tritón}}{Abs_{Fs libre+ Tritón}} \times 100 \% \quad \text{Ecuación 1}$$

Las evaluaciones espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies), en el rango de 400 nm a 750 nm, a temperatura ambiente y utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Las curvas obtenidas se procesaron con el programa OriginPro 8 SR0.

### 4.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Figura 13** muestra las curvas espectrales obtenidas para soluciones que presentaron una concentración 40  $\mu$ M, correspondientes a los Fs libres y vehiculizados en MLV, antes y después del agregado del DT. Se obtuvo una recuperación del 99,8% y del 97,9 % para los agentes fototerapéuticos AzB y AzBBr, respectivamente, con posterioridad a la desestabilización de los liposomas con Tritón X-100.

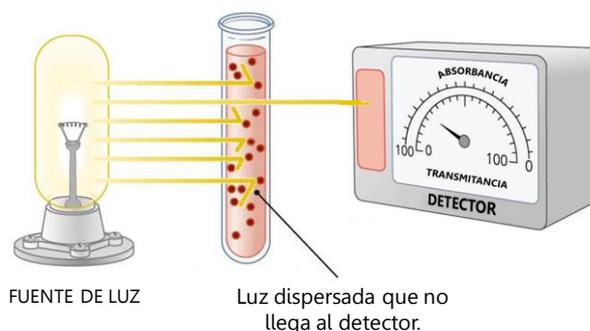
Estos resultados ponen de manifiesto que la disminución en los valores de absorbancia, ocasionada por los sistemas liposomales, no está relacionada con una inestabilidad química de los Fs tiazínicos en presencia de los fosfolípidos.



**Figura 13:** Evaluación de la estabilidad de los compuestos AzB (A) y AzBBr (B) en presencia de EPC.

## 5. EFECTO DE DISPERSIÓN OCASIONADA POR LAS VESÍCULAS MULTILAMELARES

Las MLV, como todas las partículas en suspensión, generan dispersión de la luz lo cual puede afectar las determinaciones espectrofotométricas (**Figura 14**). Existe una relación directamente proporcional entre el tamaño de las partículas suspendidas y el efecto de dispersión ocasionado. A medida que incrementa el diámetro, mayor es el efecto de dispersión de la luz. Por este motivo, se evaluó la dispersión generada y su efecto en la intensidad de absorbancia correspondiente a los Fs.



**Figura 14:** Efecto de dispersión de la luz ocasionado por MLV.

## 5.1. MATERIALES Y MÉTODOS

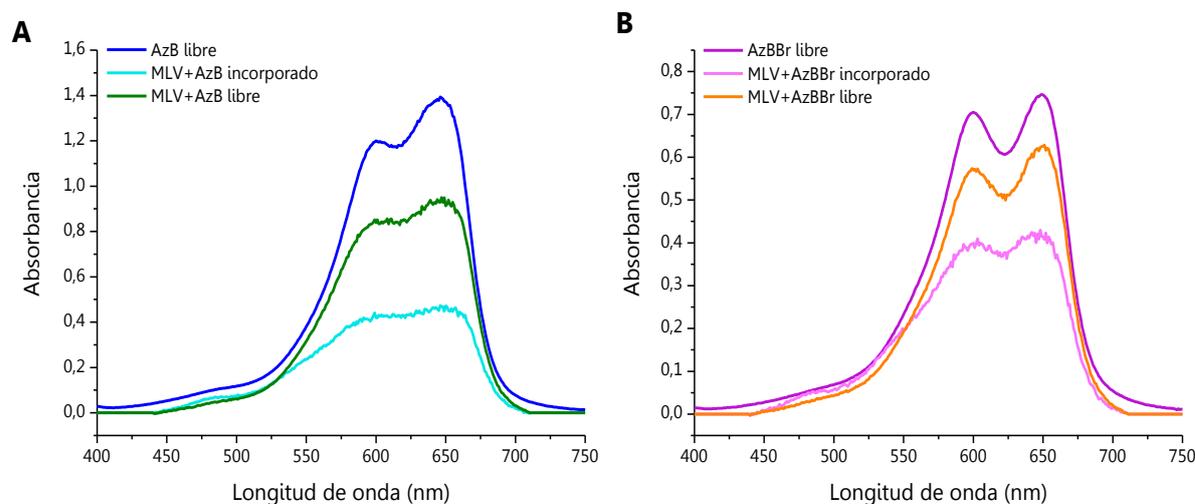
Se analizaron los espectros de absorción obtenidos para tres preparaciones diferentes:

- Solución 40  $\mu\text{M}$  de los compuestos AzB o AzBBr en solución reguladora de pH 7,4 (muestra denominada Fs libre).
- MLV, preparadas según la Sección 2.1, donde los Fs se incorporaron con los solventes orgánicos utilizados para la formación del *film* lipídico (muestra denominada MLV+Fs incorporado).
- MLV, preparadas según la Sección 2.1, donde los Fs se añadieron a los liposomas ya formados en solución acuosa, antes de realizar las determinaciones espectrofotométricas (muestra denominada MLV+Fs libre).

Las curvas espectrales se determinaron entre 400 nm y 750 nm, empleando un espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies) y una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Los resultados obtenidos se procesaron con el programa OriginPro 8 SR0.

## 5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Figura 15**, muestra que la dispersión generada por las MLV ocasiona una disminución en los valores de absorbancia correspondiente a los analitos AzB y AzBBr. Las diferencias observadas en las intensidades de las curvas espectrales respecto de los Fs libres, pueden asociarse a la disipación de luz, generada por los liposomas. Esta dispersión ocasiona



**Figura 15:** Espectros de absorción de AzB (**A**) y AzBBr (**B**) en solución, en presencia de MLV de EPC y vehiculizados en estos sistemas.

que el Fs libre no sea registrado en su totalidad por el detector espectrofotométrico. Por otra parte, la comparación espectral de MLV+Fs libre y MLV+Fs encapsulado, evidencia una marcada disminución. Estos resultados comprueban que los cambios espectrales observados para los compuestos en solución reguladora de pH 7,4 y encapsulados en liposomas multilamelares, no dependen únicamente del efecto de dispersión. La detección espectrofotométrica no permite visualizar en su totalidad a los Fs unidos a los fosfolípidos.

Se puede concluir, que la dispersión ocasiona una disminución de los valores de absorbancia de los compuestos AzB y AzBBr. Sin embargo, éste no es el único efecto involucrado en las variaciones de intensidad en las curvas espectrales determinadas para la misma concentración de Fs en solución y encapsulado en MLV. Estos resultados sugieren que la interacción de los compuestos tiazínicos con los sistemas liposomales, afecta la absorción de estos agentes fototerapéuticos.

## **6. INTERACCIÓN FOTOSENSIBILIZADOR-VESÍCULAS MULTILAMELARES**

La adecuada caracterización de las formulaciones liposomales es necesaria, con el objetivo de asegurar que cumplan las propiedades requeridas para su aplicación específica.<sup>27</sup> La localización de los fármacos en de los liposomas y sus interacciones con la bicapa lipídica es una etapa importante en la caracterización de estos sistemas vesiculares.<sup>28</sup> Por este motivo, se planteó como objetivo evaluar la ubicación de los compuestos tiazínicos en las MLV desarrolladas en esta Tesis Doctoral. En primera instancia, se determinó la constante de partición de los Fs, AzB y AzBBr, en la membrana de EPC, a fin de conocer si los mismos se incorporan a la fase lipídica o acuosa de los liposomas. Luego se estimó la localización de los Fs en la membrana liposomal mediante variaciones en la IF por transferencia de energía con dos marcadores fluorescentes.

### **6.1 DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE PARTICIÓN EN MEMBRANA**

Considerando las características anfífilas de los agentes fototerapéuticos AzB y AzBBr, se evaluaron los coeficientes de partición membrana-agua ( $K_p$ ), con el objetivo de establecer la localización liposomal de los mismos. Estas determinaciones requieren evaluar un efecto, relacionado con la partición de los compuestos en la membrana lipídica, en función del volumen de membrana ( $V_M$ ) a un volumen final constante.<sup>29</sup> Conociendo que la agregación de las estructuras tiazínicas es directamente afectada por la interacción con los fosfolípidos (Sección 3), se evaluó este fenómeno con el objetivo de predecir la localización de los Fs, AzB y AzBBr, en las MLV de EPC.

## 6.1.1. MATERIALES Y MÉTODOS

Los valores de  $K_p$  se estimaron según el método descrito por Lissi et al.<sup>29</sup> Estos ensayos consistieron en la evaluación espectrofotométrica de la agregación de los Fs en función de la concentración del agente fototerapéutico (8-46  $\mu\text{M}$ ), a diferentes volúmenes de EPC ( $V_M$ : 0-1  $\mu\text{L}$ ) utilizados en la formación de MLV, y a un volumen constante de fase acuosa ( $V_w$ : 1 mL). En una primera instancia, se determinaron las pendientes ( $P_1$ ) correspondientes a la representación gráfica de la relación de absorbancia dímero/agregado de orden superior ( $Abs^D/Abs^{AS}$ ) en función de los moles de Fs, para diferentes volúmenes de EPC (**Esquema 1**). La inversa de las pendientes obtenidas ( $1/P_1$ ) se representaron en función del  $V_M$  (**Esquema 2**). Los valores de  $K_p$  se determinaron a partir de las pendientes ( $P_2$ ) y las ordenadas al origen ( $Ord_2$ ) correspondientes a estas últimas representaciones gráficas de acuerdo a la **Ecuación 2**.

$$Abs^D/Abs^{AS} \text{ vs moles de Fs} \longrightarrow P_1 \quad \text{Esquema 1}$$

$$1/P_1 \text{ vs } V_M \longrightarrow P_2 \text{ y } Ord_2 \quad \text{Esquema 2}$$

$$K_p = \frac{P_2 \times V_w}{Ord_2} \quad \text{Ecuación 2}$$

Es importante destacar que las MLV se prepararon según se describe en la Sección 2.1, donde los Fs se incorporaron con los solventes orgánicos utilizados para la formación del *film* lipídico. Todas las muestras obtenidas se analizaron en un espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies) y los resultados obtenidos se procesaron con el programa OriginPro 8 SR0.

## 6.1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La **Tabla 2** muestra los valores obtenidos para el ajuste lineal correspondiente al estudio de agregación de los agentes fototerapéuticos AzB y AzBBr, desarrollados a diferentes concentraciones de EPC ( $V_M$ ). Estos datos se graficaron en la **Figura 16** para determinar los  $K_p$  de los Fs evaluados.

Los ensayos desarrollados evidenciaron una correlación lineal entre el fenómeno de agregación de las estructuras tiazínicas y la concentración de EPC empleada en la preparación de las MLV. Este comportamiento permitió determinar las constantes de partición membrana/agua de los Fs, AzB y AzBBr, obteniéndose valores de  $\log K_p$  de 2,29 y 2,54, respectivamente. Estos resultados indican que ambos agentes fototerapéuticos presentan mayor afinidad por la membrana lipídica que por el centro acuoso liposomal. Es importante destacar que la bromación incrementó la partición en membrana de los

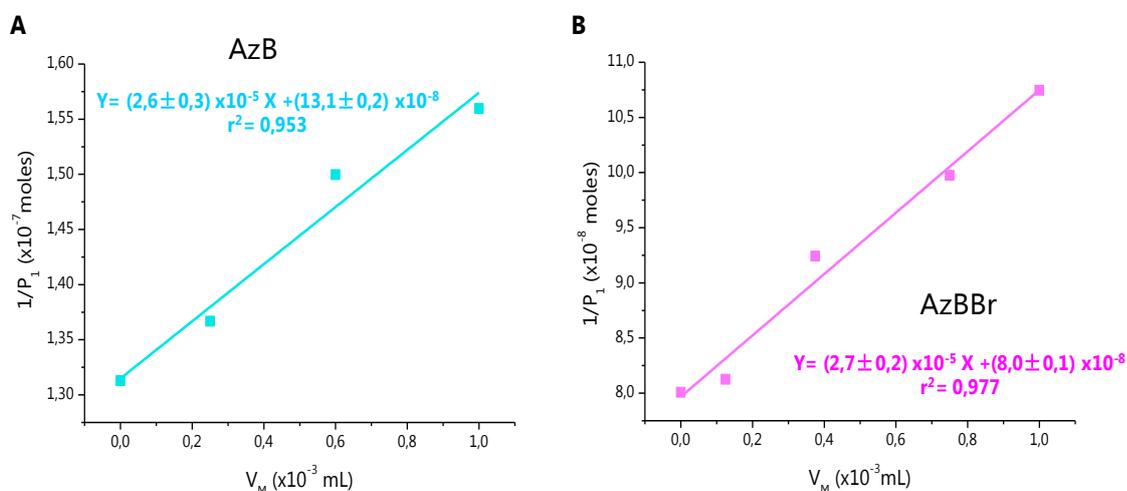
compuestos tiazínicos, resultado que se condice con el aumento de la lipofilidad observada por Montes de Oca et al para AzBBr en comparación con AzB.<sup>30</sup>

**Tabla 2:** Agregación de AzB y AzBBr en función de los moles de los Fs, para diferentes  $V_M$ .

Fs	$V_M$ ( $10^{-3}$ mL)	$P_1$ ( $10^6$ moles <sup>-1</sup> )	$Ord_1$	$r^2$
AzB	0,00	$7,6 \pm 0,2$	$0,52 \pm 0,01$	0,998
	0,25	$7,3 \pm 0,3$	$0,55 \pm 0,01$	0,994
	0,60	$6,7 \pm 0,1$	$0,56 \pm 0,01$	0,999
	1,00	$6,4 \pm 0,1$	$0,54 \pm 0,02$	0,987
AzBBr	0,00	$12,5 \pm 0,1$	$0,62 \pm 0,02$	0,987
	0,13	$12,3 \pm 0,1$	$0,59 \pm 0,01$	0,998
	0,38	$10,8 \pm 0,1$	$0,62 \pm 0,01$	0,998
	0,75	$10,0 \pm 0,1$	$0,53 \pm 0,01$	0,989
	1,00	$9,3 \pm 0,1$	$0,66 \pm 0,02$	0,971

$V_M$ : Volumen de membrana

$P_1$  y  $Ord_1$ : pendiente y ordenada al origen de la representación gráfica  $Abs^D/Abs^{AS}$  vs moles del Fs



**Figura 16:** Agregación de los compuestos AzB (A) y AzBBr (B) en función de  $V_M$ .

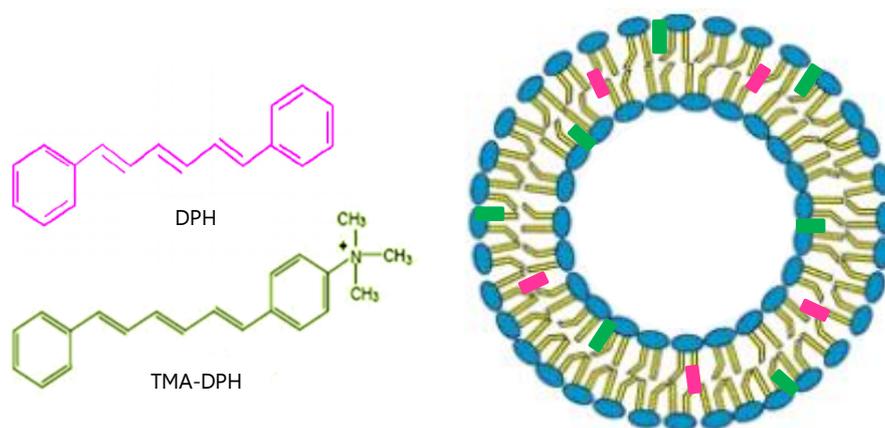
## 6.2. LOCALIZACIÓN DE LOS FOTOSENSIBILIZADORES EN LA MEMBRANA LIPÍDIDA

La transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET, siglas en inglés) es una herramienta establecida y sensible, que permite monitorear las proximidades entre diferentes moléculas en un rango de distancia muy acotado (1-10 nm).<sup>31</sup> Este proceso fotofísico ampliamente difundido, implica la transferencia de energía de un "donante" electrónicamente excitado, a una molécula "aceptora" mediante vías no radiativas.<sup>32</sup> Esta transferencia de energía tiene lugar si el espectro de emisión del donante se superpone

con el de absorción del aceptor, considerando que ambas moléculas están en un radio acotado denominado distancia de Förster. Por lo tanto, cualquier condición que afecte la distancia donante-aceptor, afectará la eficacia de la transferencia de energía.<sup>33</sup>

Numerosas metodologías han sido desarrolladas para la detección de FRET, las cuales se basan, en su mayoría, en la detección de la reducción de la vida media del donante y los cambios en las IF de las moléculas donantes yceptoras de energía. Con relación al último aspecto, se evidencia una disminución en la intensidad de fluorescencia del donante y un incremento en la correspondiente al aceptor, si la transferencia de energía resonante tiene lugar.<sup>31</sup>

Con la finalidad de evaluar la localización de las estructuras tiazínicas, AzB y AzBBr, en la bicapa lipídica de los liposomas de EPC, se analizó la FRET entre dos marcadores fluorescentes de membrana y los Fs, en presencia y ausencia de las MLV. Las sondas utilizadas en estos ensayos fueron Difenilhexatieno (DPH, siglas en inglés) y Trimetilamonio Difenilhexatieno (TMA-DPH, siglas en inglés). DPH, es un compuesto altamente lipofílico que se sitúa entre las cadenas de hidrocarburo, que conforman la membrana liposomal. Por otra parte, TMA-DPH, es un derivado catiónico de DPH, que estabiliza sus restos iónicos en las cabezas polares de los fosfolípidos, que componen la bicapa de los sistemas vesiculares. Por este motivo es considerado un marcador de la región correspondiente a los grupos polares de los fosfolípidos de membrana (**Figura 17**).<sup>34</sup>



**Figura 17:** Estructura química de los marcadores fluorescentes y su ubicación en la bicapa lipídica.

### 6.2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

Las MLV se prepararon siguiendo la metodología descrita en la Sección 2.1, con la particularidad de que se redujo al 50% la cantidad de fosfolípido utilizado. Los Fs se incorporaron en la mezcla de solventes, empleados para la formación del *film* lipídico. Todas las muestras presentaron una concentración final de 0,5 mg/mL de EPC y 80  $\mu$ M

de los compuestos AzB o AzBBr. A cada una de estas suspensiones se le añadieron diferentes volúmenes ( $\mu\text{L}$ ) de una solución concentrada de DPH o TMA-DPH (concentración en las muestras a medir: 1,15-15  $\mu\text{M}$ ) y se dejaron alcanzar el equilibrio durante 1 h, antes de realizar las determinaciones de fluorescencia.

Con el objetivo de corroborar que la FRET sólo ocurre cuando los marcadores y los Fs están unidos a las membranas de la MLV, se evaluaron soluciones de los compuestos AzB y AzBBr (80  $\mu\text{M}$ ) con diferentes concentraciones de DPH o TMA-DPH (concentración en las muestras a medir: 1,15-15  $\mu\text{M}$ ) en solución reguladora de pH 7,4.

Los espectros de emisión se registraron en el rango de 380 nm a 750 nm, en un espectrofluorímetro Spex Fluoromax-3 Jovin Yvon (Horiba) equipado con una celda termostatzada, una lámpara de arco de xenón y un arreglo de diodos como detector de señal. Las  $\lambda_{\text{ex}}$  empleadas en estos ensayos fueron las  $\lambda_{\text{max}}$  de los marcadores ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 356). Los resultados obtenidos se procesaron con el programa OriginPro 8 SR0.

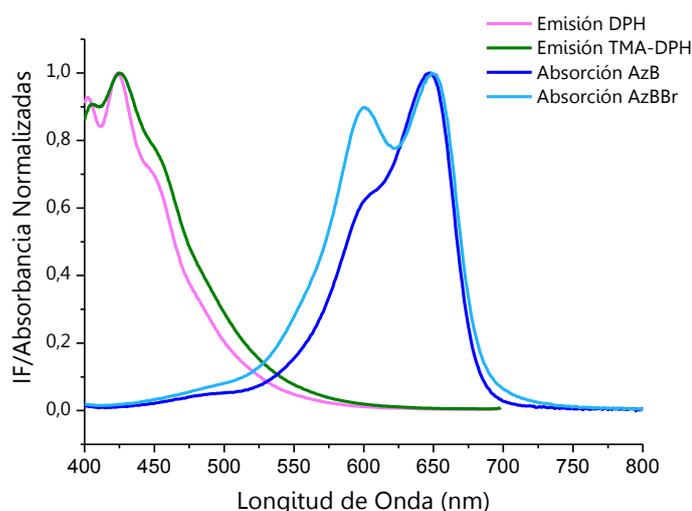
Las sondas fluorescentes, DPH y TMA-DPH, fueron adquiridas en Sigma Aldrich y se utilizaron sin purificación adicional. La solución reguladora de pH 7,4 se preparó según se detalla en la Sección 2.1, Capítulo 3, ajustando la fuerza iónica a 0,15 M con cloruro de sodio.

### 6.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

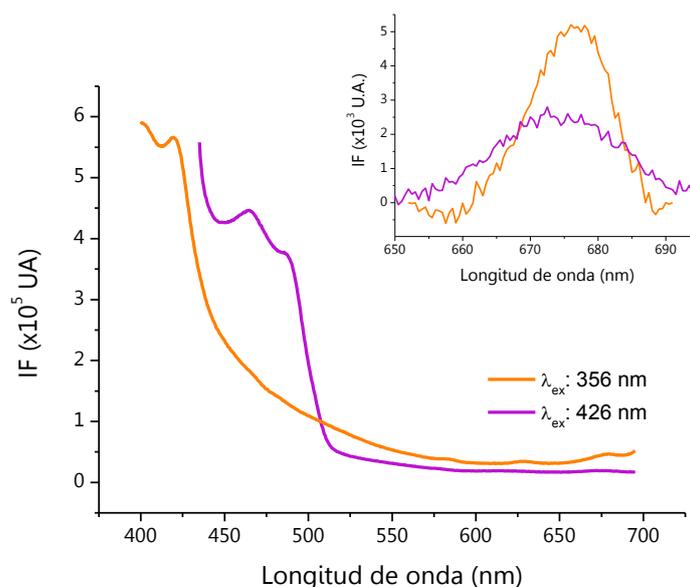
Con el objetivo de corroborar si el fenómeno de FRET entre las sondas seleccionadas y los Fs es posible, se compararon sus espectros de fluorescencia y absorbancia. En la **Figura 18**, se observa que la banda de absorción atribuible a las estructuras tiazínicas, AzB y AzBBr (compuestos aceptores), presentan una ligera superposición con las de emisión correspondientes a DPH y TMA-DPH (compuestos donantes). Estos resultados sugieren que la transferencia de energía entre los compuestos sería viable, si los mismos se encuentran a la distancia de Förster.

En la introducción, se mencionó que los estudios de FRET analizan el comportamiento de fluorescencia tanto de las moléculas dadoras como receptoras de la energía. Durante el desarrollo de este proceso, se observa una disminución de la emisión del donante y un incremento en la correspondiente al aceptor.<sup>35</sup> Con el objetivo de analizar si ambos efectos, podrían observarse en los ensayos de localización de los Fs tiazínicos, se evaluaron las curvas de fluorescencia del compuesto AzBBr, como representante de la familia de las tiazinas, excitando a las longitudes de onda de máxima absorción (356 nm, empleada como  $\lambda_{\text{ex}}$  en los ensayos de localización) y emisión (426 nm) de los marcadores. Se puede observar en la **Figura 19** que el derivado monobromado es

excitado durante el proceso de excitación de los donantes de FRET y también con la emisión de los mismos, presentando una importante banda entre 400 nm y 500 nm, región en la que fluorescen DPH y TMA-DPH por este motivo, es dificultoso realizar un análisis en este rango de longitudes de ondas, durante el proceso de transferencia de energía, ya que involucra una disminución de la fluorescencia de los marcadores y un incremento de la emisión de los Fs. Por lo expuesto, sólo es viable evaluar el comportamiento de los agentes fototerapéuticos, AzB y AzBBr, a fin de estimar la localización de los mismos en la membrana de las MLV de EPC.

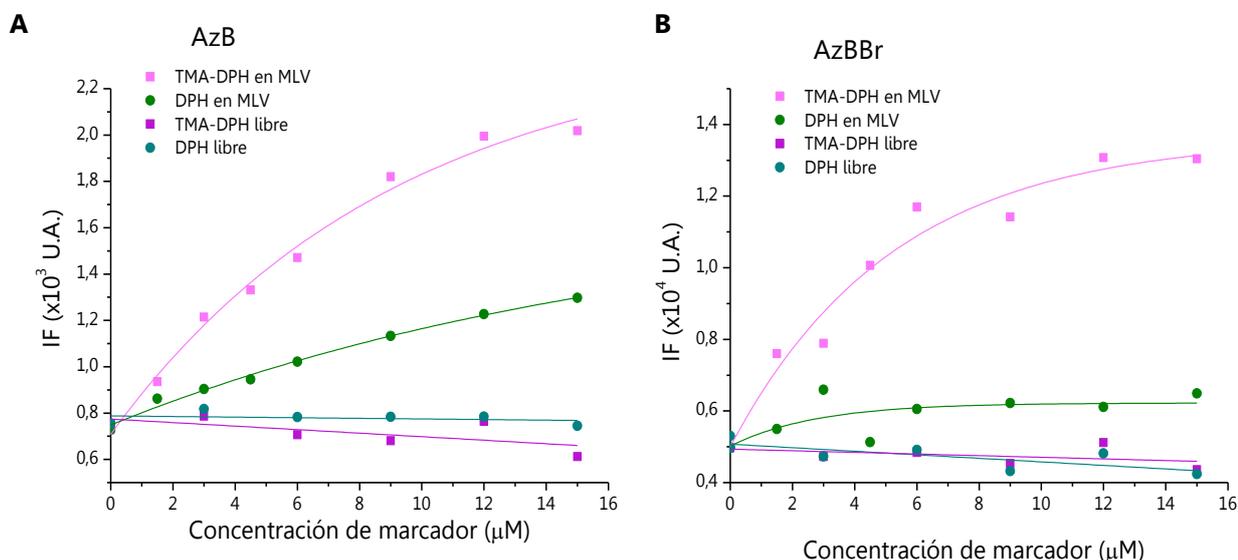


**Figura 18:** Espectros de fluorescencia ( $\lambda_{ex}$ : 356 nm) y absorción de los marcadores y Fs, respectivamente.



**Figura 19:** Espectros de emisión de AzBBr, obtenidos excitando a la  $\lambda_{ex}$  y  $\lambda_{em}$  de los marcadores de membrana. **Inserto:** Espectros ampliados entre 650 nm y 700 nm, con línea de base corregida, para comparar las bandas de fluorescencia que se analizan en los estudios de localización.

La **Figura 20** representa el efecto ocasionado en la IF atribuible a los Fs, AzB y AzBBr, en función del incremento en la concentración de DPH y TMA-DPH, cuando se encuentran vehiculizados en los liposomas o están libres en solución.



**Figura 20:** IF de AzB (A) y AzBBr (B) en presencia de los marcadores de membrana, libres en solución y encapsulados en MLV de EPC.  $\lambda_{\text{ex}}$ : 356 nm y  $\lambda_{\text{em}}$ : 679 nm

Es importante destacar que en medio acuoso, la emisión de ambos Fs se mantuvo constante en todas las muestras evaluadas. Este comportamiento pone en evidencia, que la distancia entre las moléculas donantes yceptoras de FRET, libres en solución, no posibilita la transferencia de energía. Por lo contrario, las muestras incorporadas en MLV evidenciaron un aumento exponencial en la IF correspondiente a AzB y AzBBr, indicando que el proceso de FRET se desarrolla cuando los compuestos involucrados se localizan en un radio apropiado. Este efecto fue considerablemente más importante en presencia de TMA-DPH, lo que indica que ambas estructuras tiazínicas se acomodan principalmente en la región polar de la bicapa lipídica de los sistemas de vectorización evaluados.

En conclusión, ambos Fs interactúan con la membrana lipídica de las MLV de EPC, localizándose preferentemente en la superficie hidrofílica. Estos resultados se corresponden con las características estructurales que presentan las moléculas tiazínicas.

## 7. DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA ENCAPSULACIÓN

El diseño y desarrollo de una formulación liposomal, requiere determinar la eficiencia de encapsulación (EE), es decir establecer la proporción de fármaco libre (no encapsulado) y

encapsulado.<sup>36</sup> Esto permite evaluar y controlar la calidad de los sistemas de vehiculización de fármacos.<sup>37</sup> Además, la evaluación de la EE es un requisito reglamentario en el desarrollo de nuevos vectores, siendo importante alcanzar una elevada encapsulación de ingredientes farmacéuticos activos. Para determinar la EE, el fármaco encapsulado debe separarse del libre y cuantificarse. Las técnicas más empleadas para la separación son la filtración en gel, diálisis y centrifugación. Por otra parte, la espectrofotometría y la HPLC son las técnicas analíticas utilizadas para evaluar la concentración de fármaco en las fracciones aisladas. Con el objetivo de cuantificar el fármaco encapsulado, es necesario inducir la ruptura liposomal.<sup>36</sup>

A fin de seleccionar la relación fosfolípido/Fs que permita la mayor incorporación de los compuestos tiazínicos en las MLV, se prepararon diferentes formulaciones liposomales modificando las concentraciones de EPC y Fs. Posteriormente se determinó la EE correspondiente a cada uno de los sistemas.

## 7.1. MATERIALES Y MÉTODOS

La EE se determinó en función de la concentración de lípido (1-30 mg/mL) y Fs (36-360  $\mu$ M) mediante espectrofotometría UV-Visible. Se empleó la centrifugación, a fin de separar el fármaco libre del encapsulado, y Tritón X-100 para producir la disrupción de los liposomas.

Las diferentes MLV se prepararon en un volumen final de 2 mL, según el procedimiento descrito en la Sección 2.1. El Fs se incorporó en la mezcla de solventes orgánicos empleados para la preparación del *film* lipídico. Las muestras resultantes se separaron en dos alícuotas de volúmenes equivalentes, una de ellas se empleó para determinar el 100% del Fs. La segunda alícuota se centrifugó 15 minutos a 10000 rpm para separar la estructura tiazínica libre de la encapsulada. Con posterioridad, se separó el sobrenadante de las muestras centrifugadas y el *pellet* obtenido se resuspendió en 1 mL de solución reguladora de pH 7,4. Finalmente, se añadió Tritón X-100 (35 mM) a las muestras no centrifugadas (Fs total), a los sobrenadantes (Fs libre) y a los *pellets* resuspendidos (Fs encapsulado). Las soluciones resultantes se analizaron por espectrofotometría UV-Visible. El porcentaje de encapsulación se determinó aplicando las **Ecuaciones 3 y 4**. Los resultados obtenidos se informaron como el promedio de ambas determinaciones  $\pm$  SD.<sup>38</sup>

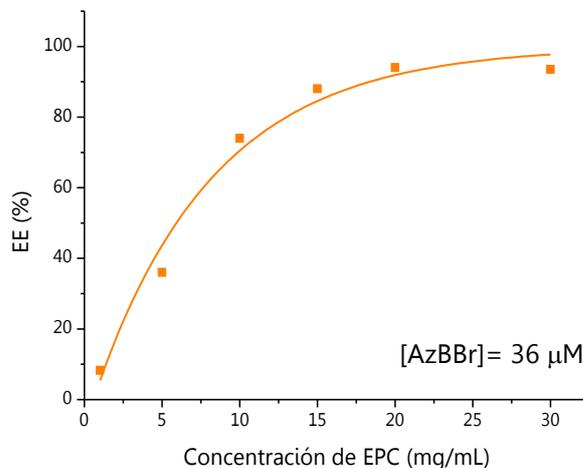
$$EE (\%) = \frac{Abs_{Fs\ encapsulado}}{Abs_{Fs\ total}} \times 100\% \quad \text{Ecuación 3}$$

$$EE (\%) = \frac{Abs_{Fs\ total} - Abs_{Fs\ libre}}{Abs_{Fs\ total}} \times 100\% \quad \text{Ecuación 4}$$

Las determinaciones espectrofotométricas se realizaron en un equipo Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies), utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. La solución reguladora de pH 7,4 se preparó según se detalla en la Sección 2.1, Capítulo 3, ajustando la fuerza iónica a 0,15 M con el agregado de cloruro de sodio. Los resultados obtenidos por duplicado se procesaron con el programa OriginPro 8 SR0.

## 7.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

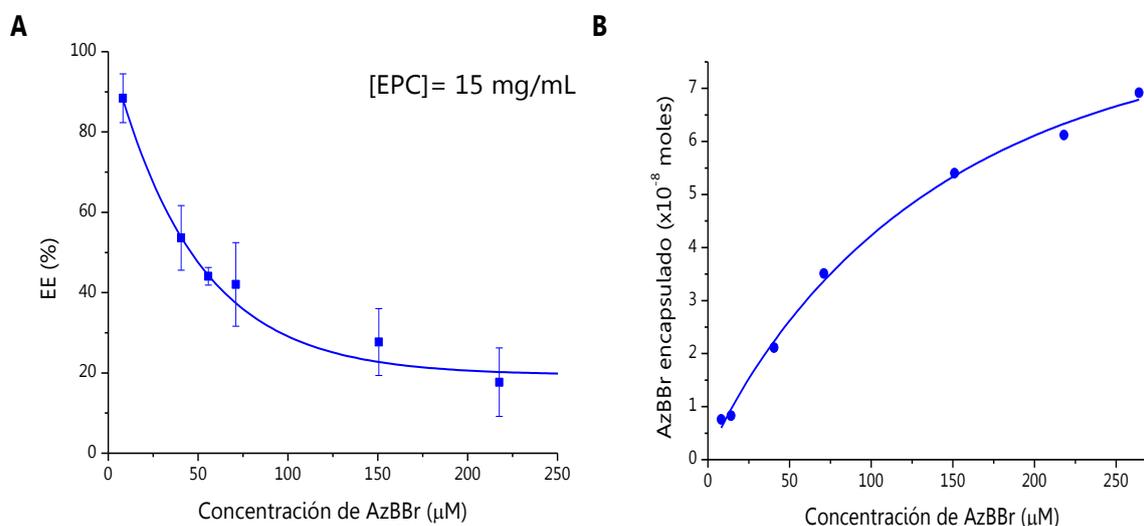
Con el objetivo de evaluar el efecto de la concentración de EPC en la EE del derivado AzBBr, se analizaron MLV preparadas a partir de diferentes concentraciones de lípidos (1-30 mg/mL), manteniendo constante la correspondientes al Fs (36  $\mu$ M). En la **Figura 21** se puede observar que la incorporación del derivado monobromado en sistemas vesiculares aumentó exponencialmente al incrementar la concentración de EPC, alcanzando un máximo de 88% con 15 mg/mL de fosfolípido.



**Figura 21:** EE de AzBBr en los sistemas liposomales a diferentes concentraciones de EPC.

Determinada la concentración óptima de EPC, se evaluó el porcentaje de encapsulación modificando la concentración del agente fototerapéutico AzBBr (36-260  $\mu$ M). La EE decreció exponencialmente con el incremento de la concentración del Fs (**Figura 22A**). Sin embargo, la incorporación de este compuesto al sistema vesicular aumentó considerablemente, logrando una encapsulación máxima de  $7 \times 10^{-8}$  moles (**Figura 22B**). En otras palabras, las muestras liposomales purificadas (sin Fs libre) alcanzaron una concentración 70 $\mu$ M de AzBBr. Con el objetivo de determinar la concentración del

derivado monobromado, se definió el coeficiente de absorptividad molar de este compuesto en una mezcla EPC + Tritón X-100 + solución reguladora de pH 7,4, obteniendo un valor de  $(18,4 \pm 0,6) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 22:** Efecto de la concentración del Fs, AzBBr, en la vehiculización en MLV de EPC, expresada como EE (**A**) y moles de Fs encapsulado (**B**).

Cabe destacar que las concentraciones de EPC y el compuesto AzBBr seleccionadas como óptimas para el desarrollo de estos Fs de tercera generación, corresponden a los valores máximos de las curvas obtenidas en las **Figura 21** y **Figura 22B**. Esto indica que el empleo de concentraciones superiores de fosfolípido y/o Fs durante la preparación de los sistemas liposomales, no afectarían significativamente la EE.

La relación EPC/Fs óptima para la vehiculización del compuesto AzBBr, se aplicó a fin de evaluar la EE atribuible al Fs AzB. Los resultados obtenidos, indican que las MLV incorporaron  $8 \times 10^{-8}$  moles del compuesto tiazínico comercial.

En conclusión, 15 mg/mL de EPC y 260  $\mu\text{M}$  del agente fototerapéutico AzBBr se seleccionaron como las condiciones óptimas para la vehiculización de este Fs y se emplearon para determinar la cantidad del compuesto AzB y el derivado monobromado en MLV de EPC. Estas condiciones de preparación, permitieron que los liposomas encapsularan  $8 \times 10^{-8}$  moles y  $7 \times 10^{-8}$  moles de los Fs, AzB y AzBBr, respectivamente.

## 8. CONCLUSIONES

Las MLV preparadas con EPC y dpPC presentaron un tamaño de partícula cercano a 1  $\mu\text{m}$  y un IP similar. La interacción de estos liposomas con los agentes fototerapéuticos AzB y AzBBr, modificó el fenómeno de agregación de los mismos, desfavoreciendo

particularmente la formación de agregados superiores del derivado monobromado. Las vesículas de EPC demostraron mayor efecto desagregante, por este motivo se seleccionaron con el objetivo de profundizar el desarrollo de Fs de tercera generación.

Las MLV produjeron una disminución en la intensidad de absorción de las estructuras tiazínicas, lo cual puede asociarse a la dispersión ocasionada por los sistemas vesiculares, como así también a la interacción de los Fs con la membrana liposomal. Por otra parte, este efecto no corresponde a la descomposición de los compuestos tiazínicos, ya que la absorción de los Fs evidenció una recuperación cercana al 100% con posterioridad a la disrupción liposomal. Tritón X-100 se seleccionó como DT para la desestabilización de las MLV de EPC, ya que este compuesto inhibe la agregación de los agentes fototerapéuticos y posibilita su correcta cuantificación.

Debido a las características estructurales de los compuestos tiazínicos, AzB y AzBBr presentaron elevada afinidad por la membrana lipídica de las MLV seleccionadas, localizándose preferentemente en la superficie hidrofílica. La relación fosfolípido-Fs que permitió la máxima vehiculización del compuesto AzBBr fue 15 mg/mL-260  $\mu$ M. Estas condiciones de preparación, permitieron que los liposomas encapsularan  $8 \times 10^{-8}$  moles y  $7 \times 10^{-8}$  moles correspondiente a los Fs, AzB y AzBBr, respectivamente. De esta manera se concluyó la etapa de elaboración y caracterización de los Fs de tercera generación, para proceder al estudio de las propiedades fotoquímicas.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Lima AM, Pizzol CD, Monteiro FBF, Creczynski-Pasa TB, Andrade GP, Ribeiro AO et al. Hypericin encapsulated in solid lipid nanoparticles: Phototoxicity and photodynamic efficiency. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2013; 125: 146–154.
- 2 Lehner R, Wang X, Marsch S, Hunziker P. Intelligent nanomaterials for medicine: Carrier platforms and targeting strategies in the context of clinical application. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2013; 9: 742–757.
- 3 Lim CK, Heo J, Shin S, Jeong K, Seo YH, Jang WD et al. Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of Cancer. *Cancer Letters* 2013; 334: 176–187.
- 4 Muehlmann LA, Joanitti GA, Silva JR, Longo JPF, Azevedo RB. Liposomal photosensitizers: Potential platforms for anticancer photodynamic therapy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2011; 44: 729–737.
- 5 Shibu ES, Hamada M, Murase N, Biju V. Nanomaterials formulations for photothermal and photodynamic therapy of cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 2013; 15: 53–72.
- 6 Yang YT, Chen CT, Tsai T. Absorption and fluorescence spectral properties of hematoporphyrin in liposomes, micelles, and nanoparticles. *Dyes and Pigments* 2013; 96: 763–769.

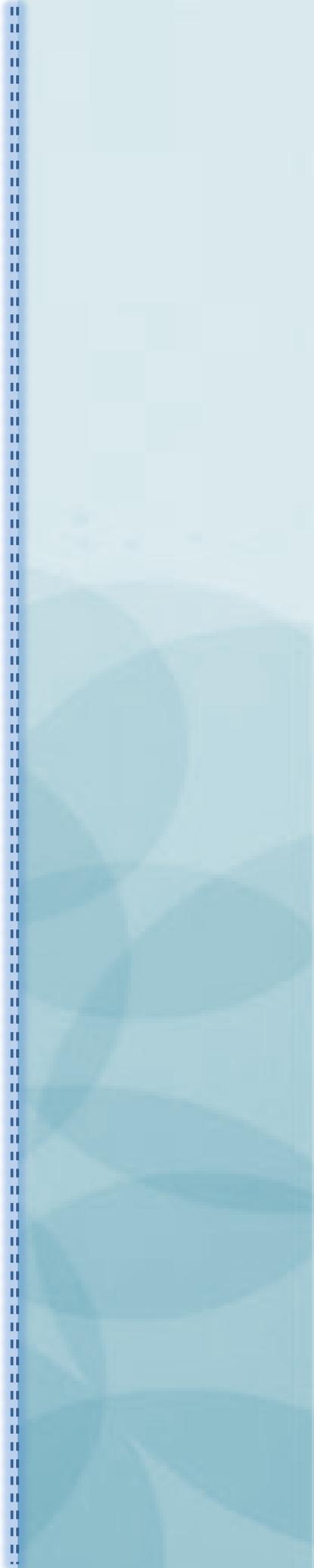
- 7 Nombona N, Maduray K, Antunes E, Karsten A, Nyokong T. Synthesis of phthalocyanine conjugates with gold nanoparticles and liposomes for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2012; 107: 35–44.
- 8 Deshmukh RR, Gawale SV, Bhagwat MK. A review on: Liposomes. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical* 2016; 5: 506–517.
- 9 Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* 2013; 8: 102.
- 10 Verma NK, Roshan A. Liposomes: A Targeted Drug Delivery System- A Review. *Acta Medica Scientia* 2015; 2: 65–70.
- 11 Conriot J, Silva JM, Fernandes JG, Silva LC, Gaspar R, Brocchini S et al. Cancer immunotherapy: nanodelivery approaches for immune cell targeting and tracking. *Frontiers in chemistry* 2014; 2: 105.
- 12 Movahedi F, Hu RG, Becker DL, Xu C. Stimuli-responsive liposomes for the delivery of nucleic acid therapeutics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2015; 11: 1575–1584.
- 13 Rani DT. Liposome as a potential drug delivery system : A review. *International Research Journal of Pharmacy* 2013; 4: 6–12.
- 14 Skupin-Mrugalska P, Piskorz J, Goslinski T, Mielcarek J, Konopka K, Düzgüneş N. Current status of liposomal porphyrinoid photosensitizers. *Drug Discovery Today* 2013; 18: 776–784.
- 15 ANMAT. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Acceso: Noviembre de 2016. Disponible en la Web: [http://www.anmat.gov.ar/boletin\\_anmat/agosto\\_2012/Dispo\\_4976-12.pdf](http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/agosto_2012/Dispo_4976-12.pdf).
- 16 Roblero Bartolón GV, Ramón Gallegos E. Uso de nanopartículas (NP) en la terapia fotodinámica (photodynamic therapy [PDT]) contra el cáncer. *Gaceta Médica de México* 2014; 151: 85–98.
- 17 Nisnevitch M, Nakonechny F, Nitzan Y. Photodynamic antimicrobial chemotherapy by liposome-encapsulated water-soluble photosensitizers. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 2010; 36: 396–402.
- 18 Przybylo M, Glogocka D, Dobrucki JW, Fraczkowska K, Podbielska H, Kopaczynska M et al. The cellular internalization of liposome encapsulated protoporphyrin IX by HeLa cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2016; 85: 39–46.
- 19 Popovska O, Simonovska J, Kavrovski Z, Rafajlovska V. An overview: methods for preparation and characterization of liposomes as drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research* 2013; 3: 182–189.
- 20 Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, Sfar S, Charcosset C, Fessi H. Preparation, characterization and applications of liposomes: state of the art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology* 2012; 1: 147–168.
- 21 Nii T, Ishii F. Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method. *International Journal of Pharmaceutics* 2005; 298: 198–205.

- 22 Colletier J-P, Chaize B, Winterhalter M, Fournier D. Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer. *BMC biotechnology* 2002; 2. doi:10.1186/1472-6750-2-9.
- 23 López Zeballos NC, Marino J, García Vior MC, Chiarante N, Roguin LP, Awruch J et al. Photophysics and photobiology of novel liposomal formulations of 2,9(10), 16(17),23(24)-tetrakis[(2-dimethylamino)ethylsulfanyl]phthalocyaninatozinc(II). *Dyes and Pigments* 2013; 96: 626–635.
- 24 Raviolo MA, Sanchez JM, Briñón MC, Perillo MA. Determination of liposome permeability of ionizable carbamates of zidovudine by steady state fluorescence spectroscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2008; 61: 188–198.
- 25 Dhimi S, De Mello AJ, Rumbles G, Bishop SM, Phillips D, Beeby A. Phthalocyanine fluorescence at high concentration: dimers or reabsorption effect? *Photochemistry and Photobiology* 1995; 61: 341–346.
- 26 Çamur M, Durmuş M, Bulut M. Highly singlet oxygen generative water-soluble coumarin substituted zinc(II) phthalocyanine photosensitizers for photodynamic therapy. *Polyhedron* 2012; 41: 92–103.
- 27 Franzen U, Østergaard J. Physico-chemical characterization of liposomes and drug substance-liposome interactions in pharmaceuticals using capillary electrophoresis and electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A* 2012; 1267: 32–44.
- 28 El Maghraby GMM, Williams AC, Barry BW. Drug interaction and location in liposomes: Correlation with polar surface areas. *International Journal of Pharmaceutics* 2005; 292: 179–185.
- 29 Lissi E, Bianconi ML, do Amaral AT, de Paula E, Blanch LEB, Schreier S. Methods for the determination of partition coefficients based on the effect of solutes upon membrane structure. *BBA - Biomembranes* 1990; 1021: 46–50.
- 30 Montes De Oca MN, Vara J, Milla L, Rivarola V, Ortiz CS. Physicochemical properties and photodynamic activity of novel derivatives of triarylmethane and thiazine. *Archiv der Pharmazie* 2013; 346: 255–265.
- 31 Bene L, Ungvári T, Fedor R, Damjanovich L. Single-laser polarization FRET (polFRET) on the cell surface. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 2014; 1843: 3047–3064.
- 32 Maity A, Mukherjee P, Das T, Ghosh P, Purkayastha P. Förster resonance energy transfer between pyrene and bovine serum albumin: Effect of the hydrophobic pockets of cyclodextrins. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2012; 92: 382–387.
- 33 Krishnaveni R, Ramamurthy P. Förster resonance energy transfer between acridinediones and selected fluorophores - Medium dependence. *Journal of Luminescence* 2013; 138: 242–250.
- 34 Sánchez JM, del V. Turina A, Perillo MA. Spectroscopic probing of ortho-nitrophenol localization in phospholipid bilayers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2007; 89: 56–62.
- 35 Jain B, Das K. Fluorescence resonance energy transfer between DPH and Nile Red in a lipid bilayer. *Chemical Physics Letters* 2006; 433: 170–174.

- 36 Ohnishi N, Yamamoto E, Tomida H, Hyodo K, Ishihara H, Kikuchi H et al. Rapid determination of the encapsulation efficiency of a liposome formulation using column-switching HPLC. *International Journal of Pharmaceutics* 2013; 441: 67–74.
- 37 Yang S, Chen J, Zhao D, Han D, Chen X. Comparative study on preparative methods of DC-Chol/DOPE liposomes and formulation optimization by determining encapsulation efficiency. *International Journal of Pharmaceutics* 2012; 434: 155–160.
- 38 Casas A, Perotti C, Saccoliti M, Sacca P, Fukuda H, Batlle AM del C. ALA and ALA hexyl ester in free and liposomal formulations for the photosensitisation of tumour organ cultures. *British journal of cancer* 2002; 86: 837–842.

# **CAPÍTULO 5**

## **PROPIEDADES FOTOQUÍMICAS DE FOTOSENSIBILIZADORES DE TERCERA GENERACIÓN**



## 1. EFECTO DE LA VEHICULIZACIÓN EN LAS PROPIEDADES FOTOQUÍMICAS DE LOS FOTOSENSIBILIZADORES

La aplicación de liposomas como sistemas de vehiculización ha contribuido a superar numerosos inconvenientes de los Fs convencionales. Muchos de ellos se caracterizan por una naturaleza hidrofóbica y, consecuentemente, baja solubilidad en medios acuosos, lo que obstaculiza el desarrollo de formulaciones farmacéuticas y favorece la agregación de estos agentes fototerapéuticos, alterando las propiedades fotoquímicas y la biodisponibilidad de los Fs. Bronshtein y colaboradores demostraron que la localización de estos fármacos en la membrana lipídica, tiene efectos relevantes sobre su eficacia fotosensibilizante.<sup>1,2</sup>

Las propiedades fotofísicas de los Fs dependen fuertemente del estado de agregación. Este fenómeno puede disminuir drásticamente el coeficiente de absorción de los compuestos, modificar las bandas espectrales y reducir los rendimientos cuánticos de fluorescencia, afectando directamente las propiedades fotoquímicas.<sup>3</sup> Con el objetivo de estabilizar a la especie fotodinámicamente activa de los Fs se han implementado dos estrategias. La primera de ellas, consiste en el desarrollo de nuevos Fs de segunda generación, basándose en la incorporación de sustituyentes hidrofílicos o voluminosos en las estructuras de los compuestos fotosensibilizantes. El incremento de la solubilidad acuosa o bien el impedimento estérico entre las moléculas disminuye la tendencia de agregación y potencia la eficacia fotodinámica.<sup>4-7</sup> La segunda estrategia involucra el empleo de diversos sistemas de vehiculización de fármacos, siendo un enfoque menos costoso y más eficiente que el desarrollo de nuevas entidades químicas, que permitan mejorar el rendimiento terapéutico de los Fs.<sup>3</sup> En las últimas décadas, numerosos investigadores han estudiado el efecto de diferentes nanotransportadores sobre las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de estos compuestos. Entre los sistemas más utilizados se destacan: liposomas, micelas, nanopartículas y dendrímeros, entre otros.<sup>8</sup> La incorporación de los Fs en los diferentes vehículos disminuye la tendencia de agregación. La relación entre las diferentes especies de agregados encapsulados, puede variar según las características del Fs, del nanotransportador empleado y de sus componentes. Sin embargo, todos ellos han presentado un incremento en la producción de  $^1\text{O}_2$ , principal especie citotóxica involucrada en la TFD y TFDA.<sup>1,3</sup>

Por otra parte, se ha demostrado que la incorporación de fármacos fotolábiles a sistemas supramoleculares, tales como liposomas, mejora su fotoestabilidad.<sup>9</sup> La fotodegradación y la estabilización de compuestos fotosensibles en formulaciones liposomales han sido abordadas por diferentes investigadores. Numerosos principios farmacéuticos activos

demonstraron muy buenos resultados al incorporarse en estos sistemas vesiculares, entre los cuales se incluyen riboflavina, doxorubicina, amlodipina, Vitamina A, RB, diferentes fluoroquinolonas y ftalocianinas.<sup>10</sup>

A diferencia de los fármacos convencionales, la estabilidad fotoquímica de los Fs condiciona la dosis de luz permitida, un parámetro indispensable en la aplicación de esta modalidad terapéutica. En este contexto, es importante destacar que la fotodegradación de numerosos Fs incorporados en MLV es significativamente menor en comparación con compuestos libres en solución reguladora de pH. Particularmente, la vehiculización de RB (Fs perteneciente a la familia de los xantenos) incrementó 10 veces su tiempo de vida media con relación al compuesto libre en medio acuoso.<sup>11</sup> Por lo expuesto, el desarrollo de Fs de tercera generación empleando sistemas liposomales es un enfoque prometedor a fin de mejorar la eficacia fotodinámica, mediante el aumento de la fotoestabilidad de los Fs y la disminución de su agregación, parámetros que podrían incrementar el rendimiento cuántico de formación de  $^1\text{O}_2$ .

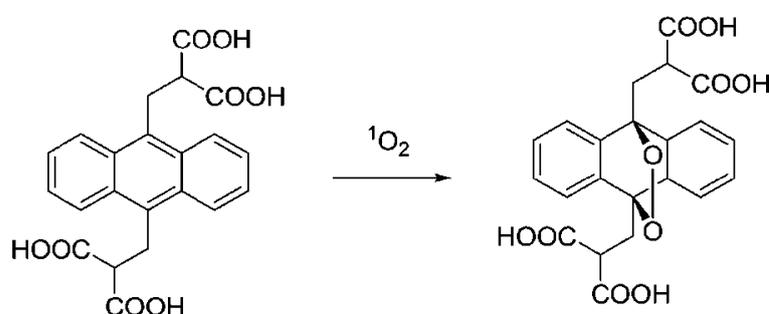
Con el objetivo de evaluar el efecto de la encapsulación de los agentes fototerapéuticos AzB y AzBBr incorporados a MLV de EPC, en las propiedades fotoquímicas de los mismos, se evaluó la fotoestabilidad y la capacidad que presentan estos Fs de tercera generación, para producir la excitación del oxígeno molecular. Conociendo que la vehiculización de los compuestos tiazínicos produjo una disminución de la agregación, principalmente del derivado monobromado (resultados presentados en Sección 3, Capítulo 4), se espera que los Fs de tercera generación presenten un incremento en la eficacia fotodinámica.

## **2. DETERMINACIÓN DE LOS RENDIMIENTOS CUÁNTICOS DE FORMACIÓN DE OXÍGENO SINGLETE.**

Como se explicó en el Capítulo 3, Sección 5, el  $^1\text{O}_2$  es una de las principales ERO involucradas en el tratamiento fotodinámico.<sup>12,13</sup> En los procesos biológicos, la transferencia de energía entre el Fs y el oxígeno molecular ocurre en un entorno acuoso. Por este motivo evaluar el  $\phi_{\Delta}$  de los Fs en agua, es un parámetro importante que permitirá predecir la eficacia terapéutica de estos compuestos. El  $^1\text{O}_2$  presenta una corta vida útil en solución acuosa, escasa solubilidad y bajo rendimiento cuántico de la transición al estado fundamental, lo cual genera que la detección directa mediante luminiscencia a 1270 nm sea un procedimiento poco utilizado.<sup>14</sup> La determinación cuantitativa de la producción de esta ERO en agua, se basa principalmente en el análisis cuantitativo de las reacciones de fotooxidación de diferentes sustratos hidrofílicos, durante el proceso de fotoexcitación del Fs. Se han propuesto varios compuestos como

atrapadores de  $^1\text{O}_2$  en medio acuoso, entre los cuales se destacan Rubrene; 1,3-difenilisobenzofurano y diferentes derivados de DMA.<sup>14-16</sup>

El ácido dimalónico de 9,10-dimetilantraceno (ABDA) es un derivado hidrofílico de DMA muy utilizado para determinar los  $\phi_\Delta$  de una gran variedad de Fs de tercera generación.<sup>16-21</sup> Este compuesto presenta un perfil espectral característico de esta familia de atrapadores de  $^1\text{O}_2$ , evidenciando un máximo de absorción absoluto alrededor de los 380 nm y cuatro bandas de absorción en el rango de 320nm a 410nm. En presencia  $^1\text{O}_2$ , ABDA se oxida formando un endoperóxido, el cual no absorbe en esta región del espectro electromagnético (**Figura 1**). Por este motivo, es posible determinar los  $\phi_\Delta$  considerando la fotooxidación de ABDA.



**Figura 1:** Reacción de ABDA en presencia de  $^1\text{O}_2$ . Formación del endoperóxido.

En estudios previos (Capítulo 3, Sección 5), se evaluó el  $\phi_\Delta$  de los agentes fototerapéuticos AzB y AzBBr, en diferentes solventes orgánicos, a fin de determinar las propiedades fotoquímicas de las especies monoméricas y diméricas de estos compuestos. A diferencia de la experiencia anterior, en esta oportunidad se evalúa la producción de  $^1\text{O}_2$  correspondiente a los Fs libres en agua, con la finalidad de corroborar que la formación de agregados superiores disminuye la generación de esta ERO, al compararla con la especie dimérica de los compuestos, tal como se describe en literatura.<sup>22,23</sup> Del mismo modo, se analiza el efecto generado, por la disminución del fenómeno de agregación de los Fs vehiculizados en las MLV (Capítulo 4, Sección 3), en comparación con los  $\phi_\Delta$  relativos, atribuibles a los compuestos AzB y AzBBr, libres en agua.

## 2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

La producción de  $^1\text{O}_2$  de los compuestos AzB y AzBBr, libres en solución acuosa y encapsulados en liposomas multilamelares de EPC, se evaluó indirectamente analizando

la fotooxidación de ABDA mediante espectrofotometría UV-Visible a diferentes tiempos de irradiación. La metodología seleccionada ha sido aplicada previamente por otros autores a fin de determinar los  $\phi_{\Delta}$  de numerosos Fs.<sup>18,24</sup>

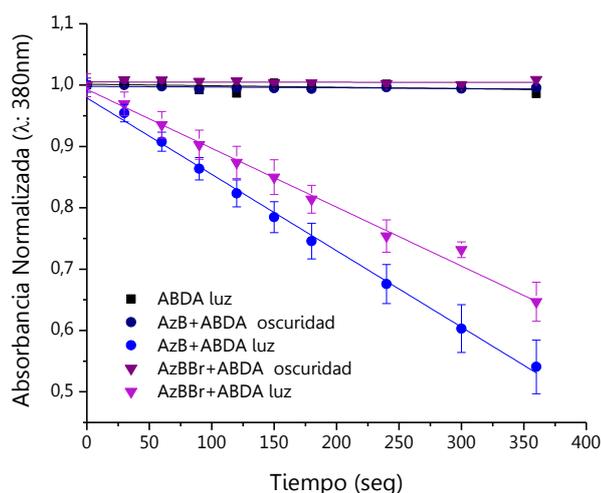
Las soluciones de los compuestos tiazínicos libres se prepararon disolviendo los Fs (absorbancia  $\sim 0,1-0,2$ ) y ABDA (absorbancia  $\sim 0,3$ ) en agua ultrapura, obtenida del sistema de purificación de agua Milli-Q® (Millipore Corporation). Las muestras liposomales se prepararon según la metodología descrita en la Sección 2.1 del Capítulo 4, utilizando 15 mg/mL de EPC y 260  $\mu\text{M}$  de los agentes fototerapéuticos AzB o AzBBR (incorporados en los solventes orgánicos empleados para la formación del *film* lipídico). Las suspensiones de MLV se centrifugaron 15 min a 10000 rpm con el objetivo de separar el Fs libre del encapsulado. Los *pellets* obtenidos (MLV+Fs encapsulado) se resuspendieron en agua ultrapura y se diluyeron de manera que la absorción correspondiente a los Fs en las suspensiones a analizar, fueron comparables con las determinadas para las muestras de los Fs libres en solución. Es importante destacar que las muestras liposomales también contenían ABDA (absorbancia  $\sim 0,3$ ).

Cada una de estas muestras se irradió durante 360 s 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 a 5 cm de distancia fue de 8,4  $\text{mW}/\text{cm}^2$ . A diferentes tiempos, las muestras se analizaron por espectrofotometría UV-Visible utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico y un espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies). Los valores de absorbancia obtenidos a 380 nm se graficaron en función del tiempo de irradiación, para cada una de las muestras, empleando el programa OriginPro 8 SR0. Las pendientes correspondientes a estas representaciones gráficas permitieron determinar el  $\phi_{\Delta}$  aplicando la Ecuación 10 descrita en el Capítulo 3. Es importante destacar, que los valores obtenidos para este parámetro se determinaron empleando el agente fototerapéutico AzB libre como referencia. Todos los ensayos se realizaron por duplicado demostrando resultados consistentes.

Con el objetivo de corroborar que la oxidación de ABDA sólo tiene lugar por acción del  $^1\text{O}_2$  generado por la excitación de los Fs, muestras equivalentes a las irradiadas, se analizaron a los diferentes tiempos protegiéndolas de la luz. También, se evaluó el comportamiento de ABDA frente a la irradiación, en ausencia de los compuestos tiazínicos, en solución acuosa y en presencia de MLV de EPC. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

## 2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis correspondiente a las muestras de los Fs libres (**Figura 2**) evidenció que los compuestos AzB y AzBBr, en ausencia de luz, no producen la oxidación de ABDA. Por otra parte, este atrapador de  $^1\text{O}_2$  demostró no formar endoperóxidos al ser irradiado, en ausencia de los compuestos tiazínicos. En conclusión, la descomposición de ABDA está relacionada con la formación de  $^1\text{O}_2$ , generado por la excitación de los Fs.



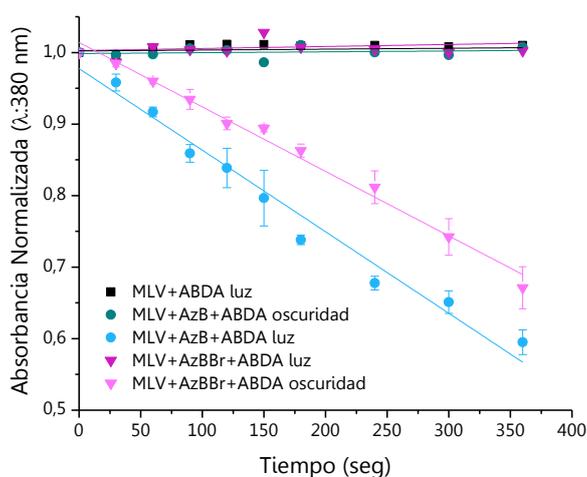
**Figura 2:** Evaluación de la fotooxidación de ABDA en agua.

También, se puede observar claramente (**Figura 2**) que el Fs AzB ocasionó mayor descomposición de ABDA en comparación con el derivado monobromado. Los resultados obtenidos de  $\phi_{\Delta}$  relativos, correspondientes a ambos compuestos tiazínicos (**Tabla 1**), permiten afirmar que, en solución acuosa, el derivado AzBBr produce aproximadamente un 40 % menos de  $^1\text{O}_2$  que su precursor. Es importante señalar que en medio acuoso, los compuestos tiazínicos exhiben un equilibrio entre diferentes especies agregadas, siendo AzBBr el que presentó mayor tendencia a la agregación (Capítulo 3, Sección 4.1.2.2.). La determinación del  $\phi_{\Delta}$  atribuible a los Fs, AzB y AzBBr, en MeOH, solvente orgánico que estabiliza a la especie dimérica de estos sustratos, evidenció que la bromación duplica el  $\phi_{\Delta}$  de AzB (Capítulo 3, Sección 5). La comparación con estos resultados permite concluir que la formación de agregados superiores en agua produce una importante disminución en la reactividad fotoquímica de estos compuestos, disminuyendo su potencial como Fs. La producción de  $^1\text{O}_2$  correspondiente al agente fototerapéutico AzBBr es mayormente afectada, obteniendo un rendimiento cuántico inferior al del precursor.

**Tabla 1:** Rendimientos cuánticos de formación de  $^1\text{O}_2$  de los Fs libres y encapsulados.

Fs	Absorbancia	Pendiente ( $\times 10^{-3}$ )	$\phi_{\Delta}$
AzB	0,16 $\pm$ 0,02	1,25 $\pm$ 0,03	1
AzBBr	0,20 $\pm$ 0,02	0,96 $\pm$ 0,02	0,61
AzB-MLV	0,09 $\pm$ 0,01	1,14 $\pm$ 0,06	1,62
AzBBr-MLV	0,08 $\pm$ 0,01	0,86 $\pm$ 0,02	1,38

La vehiculización de las estructuras tiazínicas en MLV de EPC incrementa la reactividad fotoquímica de ambos Fs, duplicando el  $\phi_{\Delta}$  del compuesto libre para el caso de AzBBr e incrementándolo en un 62 % para el fármaco AzB (**Tabla 1**). Estos resultados pueden asociarse a la disminución en la agregación que presentan los agentes fotodinámicos, principalmente el derivado monobromado, ocasionada por la encapsulación en el sistema liposomal, al compararlos con los compuestos libres (Capítulo 4, Sección 3). Es importante destacar que la incorporación de los Fs, AzB y AzBBr, en las vesículas seleccionadas, disminuyó parcialmente la formación de agregados superiores. De lo expuesto se desprende que las modificaciones en la composición de estos sistemas de vectorización podrían optimizar las propiedades fotoquímicas de los Fs. La **Figura 3** muestra que las MLV, irradiadas en ausencia de los agentes fotodinámicos como así también, cargadas con ambos compuestos tiazínicos en oscuridad, no producen la degradación de ABDA.

**Figura 3:** Evaluación de la fotooxidación de ABDA.

En conclusión, la formación de agregados superiores afecta la capacidad generadora de  $^1\text{O}_2$  que presenta la especie fotodinámicamente activa de los Fs, AzB y AzBBr. La

incorporación de estos agentes fototerapéuticos en liposomas multilamelares de EPC, disminuyó la tendencia a la agregación y en consecuencia incrementó los  $\phi_{\Delta}$ . Particularmente, el desarrollo de estos Fs de tercera generación permitió duplicar la producción de  $^1\text{O}_2$  correspondiente al derivado monobromado en solución acuosa.

### 3. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD FOTOQUÍMICA

La bromación del Fs AzB aceleró el proceso de degradación fotoquímica de este compuesto en medio acuoso (Capítulo 3, Sección 3.3). Esta propiedad es desfavorable para un Fs, considerando que el mismo requiere una dosis de luz apropiada para ejercer su efecto terapéutico.<sup>25</sup>

Un Fs ideal debe ser estable en condiciones de oscuridad e irradiación. Frente a la exposición a la luz, estos compuestos deben poseer la capacidad de alcanzar el estado triplete excitado y transferir su energía a las moléculas del entorno (como el oxígeno, entre otras), retornando al estado fundamental sin desarrollar reacciones de fotodegradación. De esta manera, los agentes fototerapéuticos podrán excitarse nuevamente y generar más especies citotóxicas. Sin embargo, numerosos Fs se descomponen luego de la irradiación lumínica dando origen a diferentes productos de degradación que pueden incrementar los efectos adversos de la aplicación terapéutica.<sup>26</sup>

Diversas estrategias de vehiculización de fármacos han sido investigadas a fin de incrementar la estabilidad fotoquímica de diferentes agentes fototerapéuticos. La encapsulación de AM, RB, Hypocrellin A y gran variedad de cianinas, porfirinas y ftalocianinas en micelas, nanopartículas, nanocápsulas de sílica, membranas de intercambio iónico, liposomas y cucurbituril, entre otros sistemas, fueron alternativas efectivas para disminuir la fotodegradación de los Fs en solución acuosa.<sup>11,25,27-33</sup>

Diferentes autores, han demostrado que las formulaciones liposomales protegen exitosamente a los agentes fototerapéuticos de la inactivación inducida por la luz.<sup>11,34</sup>

La encapsulación de los Fs, AzB y AzBBr en MLV de EPC, tiene como objetivo incrementar la estabilidad fotoquímica de estos compuestos, principalmente la correspondiente al derivado monobromado. Por este motivo, con posterioridad a la preparación y caracterización del Fs de tercera generación (Capítulo 4), se propuso evaluar el efecto de la vehiculización sobre la fotoestabilidad del Fs AzBBr.

#### 3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

La estabilidad fotoquímica del compuesto AzBBr en las vesículas liposomales se evaluó en términos de la absorción en función de la exposición a la luz. Las MLV de EPC se

prepararon en base a la metodología descrita en la Sección 2.1., Capítulo 4, empleando la relación fosfolípido-Fs (15 mg/mL - 260  $\mu$ M), seleccionadas como óptimas para la preparación de estos sistemas. Posteriormente, se procedió a eliminar el fármaco no encapsulado mediante la centrifugación de las muestras a 10000 rpm durante 15 min. El *pellet* obtenido se resuspendió en 1 mL de solución reguladora de pH 7,4. Esta muestra se irradió durante 120 min, utilizando una lámpara LED Parathom® (5w, OSRAM) posicionada a 5 cm de distancia, siendo la intensidad de irradiación de 8,4 mW/cm<sup>2</sup> (**Figura 4**). Alícuotas de 200  $\mu$ L de esta suspensión se extrajeron cada 10 min y luego se diluyeron con 800  $\mu$ L de solución reguladora de pH 7,4 y 10 $\mu$ L de Tritón X-100. Este DT se utilizó para producir la disrupción liposomal y la liberación del Fs, con el objetivo de cuantificarlo correctamente mediante espectrofotometría UV-Visible.

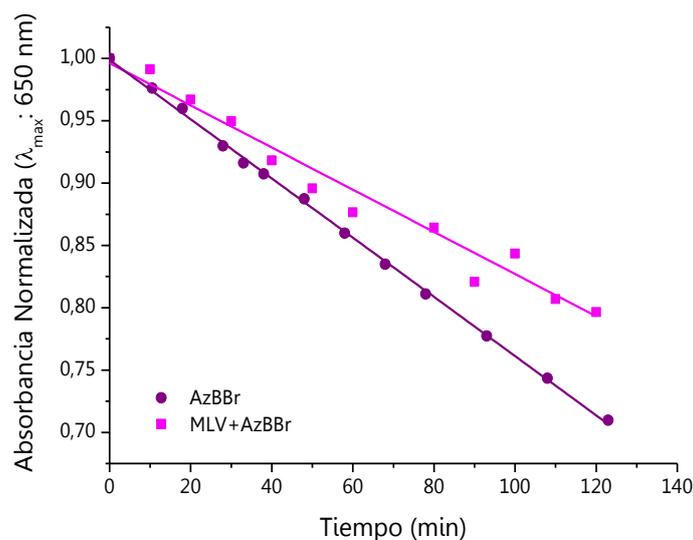


**Figura 4:** Estudios de fotoestabilidad: irradiación de las MLV+AzBBr.

Los espectros de absorción se determinaron en el rango 200 nm a 800 nm mediante un espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies), utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Los datos obtenidos se procesaron con el programa OriginPro 8 SR0 y se compararon con la correspondiente fotodegradación del Fs AzBBr libre en solución reguladora de pH 7,4 (Capítulo 3, Sección 3.3).

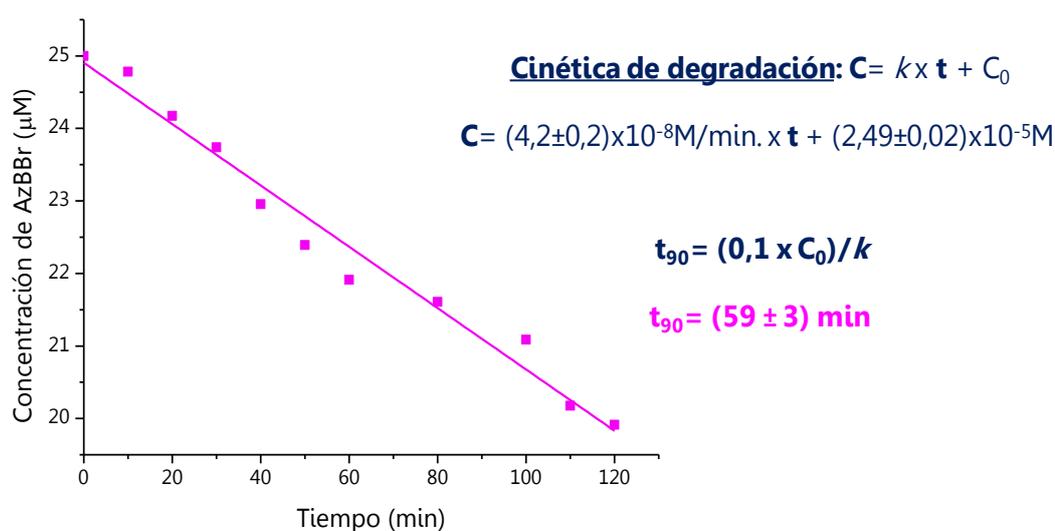
### 3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Figura 5** permite comparar la degradación fotoquímica de AzBBr libre y encapsulado en MLV de EPC mediante la representación gráfica de la absorbancia determinada a 650 nm,  $\lambda_{\max}$  correspondiente al Fs, en función del tiempo de irradiación. Se puede observar que la vehiculización en el sistema liposomal redujo la velocidad de fotodescomposición del compuesto monobromado.



**Figura 5:** Fotodegradación del compuesto AzBBr libre y encapsulado en MLV de EPC.

Con el objetivo de determinar el  $t_{90}$  correspondiente a este derivado tiazínico incorporado a los sistemas vesiculares, se analizó la representación gráfica de la concentración del Fs AzBBr a los diferentes tiempos de irradiación (**Figura 6**). Las concentraciones del agente fototerapéutico en solución, se determinaron a partir del correspondiente  $\epsilon$  del fármaco, en un medio comparable a las condiciones experimentales de este ensayo (iguales concentración de EPC y Tritón X-100 en solución reguladora de pH 7,4). El valor de esta constante es  $\epsilon = (23 \pm 1) \times 10^3 \text{ L M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (datos no mostrados).



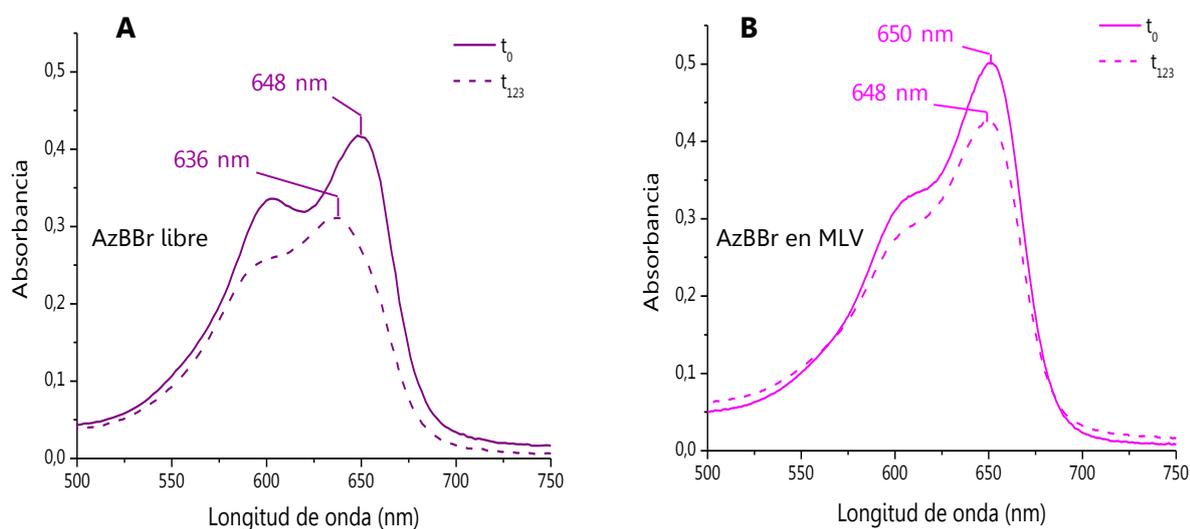
**Figura 6:** Cinética de degradación fotoquímica del Fs AzBBr encapsulado en MLV de EPC.

Determinación del  $t_{90}$ , ( $C_0$  es la concentración inicial del Fs y  $C$  a los diferentes tiempo;

$t$  es el tiempo de irradiación y  $k$  la pendiente.)

El  $t_{90}$  correspondiente al compuesto AzBBr libre, en solución reguladora de pH 7,4, se determinó en la Sección 3.3, Capítulo 3, y presentó un valor de  $32 \pm 2$  min. El desarrollo del Fs de tercera generación permitió incrementar un 86 % el tiempo de vida útil del Fs monobromado ( $t_{90} = (59 \pm 3)$  min).

Por otra parte, los estudios de fotoestabilidad del compuesto tiazínico bromado evidenciaron, además de una disminución en la absorción, un corrimiento hipsocrómico de la  $\lambda_{\max}$  del Fs (**Figura 7**). Como se expresó en la Sección 3.3, Capítulo 3, este comportamiento podría asociarse a los mecanismos de degradación catalítica descritos previamente para esta familia de compuestos, el cual consiste en sucesivas demetilaciones, deaminaciones, ruptura de los anillos aromáticos y finalmente la mineralización del Fs.<sup>35,36</sup>



**Figura 7:** Espectros de absorción de AzBBr (A) libre en solución reguladora de pH 7,4 y (B) encapsulado en MLV de EPC, registrados a  $t_0$  y  $t_{123}$  del estudio de fotoestabilidad.

La **Figura 7**, muestra que la encapsulación del Fs disminuyó el desplazamiento de la curva espectral, confirmando el incremento de la fotoestabilidad del derivado AzBBr. El Fs libre en solución acuosa, **Figura 7A**, evidenció un corrimiento hipsocrómico de 12 nm, en tanto que el compuesto vehiculizado en MLV de EPC, **Figura 7B**, sólo presentó un desplazamiento de 2 nm, al transcurrir 2 h de irradiación.

En conclusión, los estudios de estabilidad fotoquímica demostraron que el desarrollo de Fs de tercera generación permitió incrementar la fotoestabilidad del derivado AzBBr, agente fototerapéutico que presentó una significativa degradación en solución acuosa. El

$t_{90}$  del derivado AzBBr encapsulado en MLV de EPC se duplicó respecto al Fs libre. Este incremento en la estabilidad fotoquímica también se evidenció en los perfiles de las curvas espectrales registradas durante el desarrollo del ensayo.

#### 4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sustentan que la vehiculización de los compuestos tiazínicos en liposomas multilamelares de EPC, permite mejorar las propiedades fotoquímicas de los Fs de segunda generación, evaluados en el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

La disminución en la formación de agregados superiores ocasionada por la vehiculización en MLV, produce un incremento en el rendimiento cuántico de la producción de  $^1\text{O}_2$  para los compuestos AzB y AzBBr, al compararlos con los Fs libres en solución acuosa.

Por otra parte, el desarrollo de Fs de tercera generación disminuye la degradación fotoquímica del derivado monobromado, lo que permitiría duplicar la dosis de luz aplicada en el tratamiento fotodinámico.

En conclusión, la vehiculización de los Fs tiazínicos en liposomas MLV de EPC es una estrategia exitosa, que permite mejorar las propiedades fisicoquímicas, fotofísicas y principalmente fotoquímicas de los Fs, AzB y AzBBr.

#### 5. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Skupin-Mrugalska P, Piskorz J, Goslinski T, Mielcarek J, Konopka K, Düzgünes N. Current status of liposomal porphyrinoid photosensitizers. *Drug Discovery Today* 2013; 18: 776–784.
- 2 Bronshtein I, Afri M, Weitman H, Frimer A a, Smith KM, Ehrenberg B. Porphyrin depth in lipid bilayers as determined by iodide and parallax fluorescence quenching methods and its effect on photosensitizing efficiency. *Biophysical journal* 2004; 87: 1155–1164.
- 3 Yang YT, Chen CT, Tsai T. Absorption and fluorescence spectral properties of hematoporphyrin in liposomes, micelles, and nanoparticles. *Dyes and Pigments* 2013; 96: 763–769.
- 4 Chin Y, Lim SH, Zorlu Y, Ahsen V, Kiew LV, Chung LY et al. Improved photodynamic efficacy of Zn(II) phthalocyanines via glycerol substitution. *PLoS ONE* 2014; 9: 1–11.
- 5 Chakraborty A, Ali M, Saha SK. Molecular interaction of organic dyes in bulk and confined media. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2010; 75: 1577–1583.
- 6 Li XS, Guo J, Zhuang JJ, Zheng BY, Ke MR, Huang JD. Highly positive-charged zinc(II) phthalocyanine as non-aggregated and efficient antifungal photosensitizer. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2015; 25: 2386–2389.

- 7 Kostka M, Zimcik P, Miletin M, Klemnera P, Kopecky K, Musil Z. Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2006; 178: 16–25.
- 8 Lucky SS, Soo KC, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy. *Chemical Reviews* 2015; 115: 1990–2042.
- 9 Bhalekar MR, Harinaratana D, Madgulkar AR, Pandya SJ, Jain DK. Improvement of Photostability in Formulation: A Review. 2008; 20: 5095–5108.
- 10 Ahmad I, Arsalan A, Ali SA, Bano R, Munir I, Sabah A. Formulation and stabilization of norfloxacin in liposomal preparations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2016; 91: 208–215.
- 11 Fadel M, Kassab K. Evaluation of the photostability and photodynamic efficacy of Rose Bengal loaded in multivesicular liposomes. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2011; 10: 289–297.
- 12 Ferreira DP, Conceição DS, Calhella RC, Sousa T, Socoteanu R, Ferreira ICFR et al. Porphyrin dye into biopolymeric chitosan films for localized photodynamic therapy of cancer. *Carbohydrate Polymers* 2016; 151: 160–171.
- 13 Yano S, Hirohara S, Obata M, Hagiya Y, Ogura S ichiro, Ikeda A et al. Current states and future views in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 2011; 12: 46–67.
- 14 Craig RA, McCoy CP, De Baróid ÁT, Andrews GP, Gorman SP, Jones DS. Quantification of singlet oxygen generation from photodynamic hydrogels. *Reactive and Functional Polymers* 2015; 87: 1–6.
- 15 Bonacin JA, Engelmann FM, Severino D, Toma HE, Baptista MS. Singlet oxygen quantum yields in water using beetroot extract and an array of LEDs. *J Braz Chem Soc* 2009; 20: 31–36.
- 16 Tao X, Yang YJ, Liu S, Zheng YZ, Fu J, Chen JF. Poly(amidoamine) dendrimer-grafted porous hollow silica nanoparticles for enhanced intracellular photodynamic therapy. *Acta Biomaterialia* 2013; 9: 6431–6438.
- 17 Wang B, Wang J-H, Liu Q, Huang H, Chen M, Li K et al. Rose-bengal-conjugated gold nanorods for in vivo photodynamic and photothermal oral cancer therapies. *Biomaterials* 2014; 35: 1954–66.
- 18 Hayden SC, Austin LA, Near RD, Ozturk R, El-Sayed MA. Plasmonic enhancement of photodynamic cancer therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2013; 269: 34–41.
- 19 Gualdesi MS, Igarzabal CIA, Vara J, Ortiz CS. Synthesis and physicochemical properties of polyacrylamide nanoparticles as photosensitizer carriers. *International Journal of Pharmaceutics* 2016; 512: 213–218.
- 20 Li D, Lv L, Sun P, Zhou W, Wang P, Wu J et al. The facile synthesis of novel phenothiazine derivatives for blue, yellow-green, and red light emission. *Dyes and Pigments* 2009; 83: 180–186.
- 21 Lv J, Yi Y, Wu G, Liu W. Gold nanotriangles: Green synthesis and PDT & PTT effect.

- Materials Letters 2017; 187: 148–150.
- 22 Tardivo JP, Del Giglio A, De Oliveira CS, Gabrielli DS, Junqueira HC, Tada DB et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2005; 2: 175–191.
  - 23 Peloi LS, Soares RRS, Biondo CEG, Souza VR, Hioka N, Kimura E. Photodynamic effect of led light on cell growth inhibition induced by methylene blue. *Journal Biosciences* 2008; 33: 1–7.
  - 24 Nombona N, Maduray K, Antunes E, Karsten A, Nyokong T. Synthesis of phthalocyanine conjugates with gold nanoparticles and liposomes for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2012; 107: 35–44.
  - 25 Wang X, Chai Z, Ma R, Zhao L, Zhang Z, An Y et al. Enhancement of the photostability and photoactivity of metallo-meso-5,10,15,20-tetrakis-(4-sulfonatophenyl)porphyrins by polymeric micelles. *Journal of Colloid and Interface Science* 2012; 388: 80–85.
  - 26 Rojkiewicz M, Kuś P, Kozub P, Kempa M. The synthesis of new potential photosensitizers. *Dyes and Pigments* 2013; 99: 627–635.
  - 27 Zhou L, Liu JH, Zhang J, Wei SH, Feng YY, Zhou JH et al. A new sol-gel silica nanovehicle preparation for photodynamic therapy in vitro. *International Journal of Pharmaceutics* 2010; 386: 131–137.
  - 28 Vasil'ev V V., Borisov SM. Optical oxygen sensors based on phosphorescent water-soluble platinum metals porphyrins immobilized in perfluorinated ion-exchange membrane. *Sensors and Actuators, B: Chemical* 2002; 82: 272–276.
  - 29 Bazylińska U, Pietkiewicz J, Saczko J, Nattich-Rak M, Rossowska J, Garbiec A et al. Nanoemulsion-templated multilayer nanocapsules for cyanine-type photosensitizer delivery to human breast carcinoma cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012; 47: 406–420.
  - 30 Borisov SM, Lehner P, Klimant I. Novel optical trace oxygen sensors based on platinum(II) and palladium(II) complexes with 5,10,15,20-meso-tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)-porphyrin covalently immobilized on silica-gel particles. *Analytica Chimica Acta* 2011; 690: 108–115.
  - 31 Zhang H, Liu L, Gao C, Sun R, Wang Q. Enhancing photostability of cyanine dye by cucurbituril encapsulation. *Dyes and Pigments* 2012; 94: 266–270.
  - 32 Rossetti FC, Lopes LB, Carollo ARH, Thomazini JA, Tedesco AC, Bentley MVLB. A delivery system to avoid self-aggregation and to improve in vitro and in vivo skin delivery of a phthalocyanine derivative used in the photodynamic therapy. *Journal of Controlled Release* 2011; 155: 400–408.
  - 33 He X, Wu X, Wang K, Shi B, Hai L. Methylene blue-encapsulated phosphonate-terminated silica nanoparticles for simultaneous in vivo imaging and photodynamic therapy. *Biomaterials* 2009; 30: 5601–5609.
  - 34 Hjálmsdóttir Á, Bühler C, Vonwil V, Roveri M, Håkerud M, Wäckerle-Men Y et al. Cytosolic delivery of liposomal vaccines by means of the concomitant photosensitization of phagosomes. *Molecular Pharmaceutics* 2016; 13: 320–329.
  - 35 Martínez SS, Uribe EV. Enhanced sonochemical degradation of azure B dye by the

electroFenton process. *Ultrasonics Sonochemistry* 2012; 19: 174–178.

- 36 Luan J, Zhao W, Feng J, Cai H, Zheng Z, Pan B et al. Structural, photophysical and photocatalytic properties of novel Bi<sub>2</sub>AlVO<sub>7</sub>. *Journal of Hazardous Materials* 2009; 164: 781–789.

## CONCLUSIONES GENERALES

---

Frente al desafío de optimizar las propiedades de los Fs comerciales, diferentes estrategias de síntesis y vehiculización de fármacos han sido aplicadas para el desarrollo de nuevos Fs de segunda y tercera generación, con la finalidad de incrementar su eficacia fotodinámica.

Los derivados MG<sup>III</sup>I<sub>2</sub> y AzBI se obtuvieron con alto grado de pureza. La yodación incrementó la longitud de onda de máxima absorción de ambos Fs, mejorando de esta manera una propiedad fotofísica relevante para este grupo de fármacos. Sin embargo, la halogenación favoreció la formación de la especie carbinol de MG<sup>III</sup>I<sub>2</sub>, efecto que disminuye la reactividad fotoquímica de los triarilmetanos. Por otra parte, la yodación de AzB incrementó sustancialmente el  $\phi_{\Delta}$  del Fs tiazínico.

Cabe destacar, que no se evidenciaron diferencias significativas en las propiedades fotofísicas y fotoquímicas correspondientes a los compuestos AzBI y AzBBr. Siendo la reacción de bromación más sencilla y eficiente que la yodación, se seleccionó el derivado bromado de AzB como Fs líder para estudiar en profundidad durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Entre las propiedades fisicoquímicas relevantes en el desarrollo de nuevos agentes fototerapéuticos, es importante destacar que los Fs seleccionados (AzB y AzBBr) presentaron valores de pKa próximos a 11, motivo por el cual la especie catiónica es la única presente en condiciones fisiológicas, lo que contribuiría a la selectividad por las células blanco. Los Fs tiazínicos presentaron elevada estabilidad química a pH 7,4 y 37°C en oscuridad. Sin embargo, los ensayos de fotoestabilidad revelaron que el  $t_{90}$  correspondiente al compuesto AzB disminuyó un 68% por efecto de la halogenación, valores que condicionan la dosis de luz aplicable en los estudios de actividad fotodinámica.

Por otra parte, los estudios de agregación permitieron identificar a la especie monomérica de los Fs tiazínicos ( $\lambda_{\max}$ : 500 – 540 nm), que por décadas fue asignada erróneamente. Esta especie presenta, simultáneamente, la capacidad de generar <sup>1</sup>O<sub>2</sub> y de actuar como *quencher* físico. El aumento de la concentración del Fs y la disminución de la temperatura, favorecieron la formación de J-agregados (dímeros -  $\lambda_{\max}$  > 600nm) que

en solución acuosa, generaron agregados de orden superior ( $\lambda_{\text{max}}$ : 550 – 625 nm). La dimerización impidió la formación del excíplejo intermediario en la desactivación física del  $^1\text{O}_2$ , por lo que la especie dimérica demostró ser buena productora de esta ERO. La formación de agregados mayores disminuyó la reactividad fotoquímica correspondientes a los Fs tiazínicos.

Además, la bromación de AzB duplicó el  $\phi_{\Delta}$ , lo cual permite afirmar que la forma dimérica del agente fototerapéutico AzBBr, es un excelente candidato para su aplicación en TFD y TFDA.

Liposomas multilamelares de EPC se seleccionaron para el desarrollo de Fs de tercera generación, ya que este fosfolípido presenta mayor interacción con los compuestos tiazínicos. Las características estructurales de los compuestos AzB y AzBBr, permiten explicar la localización de los mismos, preferentemente, en la superficie anfífilica de la membrana liposomal. La relación fosfolípido-Fs seleccionada como óptima (15 mg/mL - 260  $\mu\text{M}$ ), permitió encapsular  $8 \times 10^{-8}$  moles y  $7 \times 10^{-8}$  moles correspondientes a los compuestos AzB y AzBBr, respectivamente.

La vehiculización de los agentes fototerapéuticos AzB y AzBBr, en liposomas multilamelares de EPC demostró ser una estrategia exitosa, que mejoró significativamente las propiedades fotoquímicas de los Fs de segunda generación. Las MLV disminuyeron la formación de agregados superiores de los agentes fototerapéuticos AzB y AzBBr, y consecuentemente incrementaron sus  $\phi_{\Delta}$  en comparación con los Fs libres. El desarrollo de Fs de tercera generación disminuyó la degradación fotoquímica del derivado monobromado, lo cual permitiría duplicar la dosis de luz apropiada en el tratamiento fotodinámico con este compuesto.

## PROYECCIONES

---

A partir de los resultados y conclusiones obtenidas en el marco de esta Tesis Doctoral, se desprenden principalmente dos proyecciones:

- Evaluar la actividad fotodinámica de los Fs de segunda y tercera generación, frente a diferentes microorganismos y células tumorales.

Los Fs tiazínicos presentan un gran potencial en el tratamiento de enfermedades causadas por diferentes bacterias, como consecuencia de su capacidad de interactuar selectivamente con estos microorganismos.<sup>1-3</sup> A diferencia de los antibióticos, que actúan sobre un sitio específico en una célula bacteriana, el proceso fotodinámico ocasiona un daño inespecífico de los componentes celulares potencialmente sometidos a reacciones oxidativas. De este modo, las bacterias no desarrollan resistencia al tratamiento con Fs y se alcanza una terapia altamente selectiva que no presenta efectos adversos relevantes en el huésped.<sup>4</sup>

Los compuestos tiazínicos presentan bastos antecedentes en la TFDA, siendo también prometedores agentes fototerapéuticos en el tratamiento de enfermedades oncológicas, tales como carcinoma de células basales y sarcoma de Kaposi.<sup>5</sup>

Lo planteado anteriormente permite proponer la evaluación de: a) la inactivación fotodinámica de diferentes especies bacterianas *Gram*-positivas y *Gram*-negativas en estado planctónico, como así también formando *biofilms* y b) la eficacia en la fotoinactivación de células tumorales en cultivo.

- Modificar las MLV con el objetivo de incrementar su eficacia de vehiculización y optimizar el tratamiento fotodinámico.

Diferentes innovaciones tecnológicas han permitido modificar los liposomas convencionales, dando origen a una gran variedad de vesículas lipídicas con mayor vida media en el organismo y una liberación sitio específica del fármaco. Estudios previos han demostrado que la adición de Polietilenglicol a la superficie liposomal, aumenta significativamente el tiempo de vida en circulación sanguínea, reduciendo el reconocimiento y la interacción con las proteínas plasmáticas y macrófagos del sistema

reticuloendotelial.<sup>6</sup> Además, la incorporación de este polímero aumenta la superficie hidrofílica de los liposomas, lo cual podría impedir la agregación de estos sistemas vesiculares e incrementar la eficacia de encapsulación de fármacos que interactúen con la membrana liposomal.<sup>7,8</sup>

Otra estrategia empleada en el diseño liposomal es disminuir su tamaño a fin de optimizar la acumulación pasiva de los Fs en el tejido a tratar.<sup>7</sup> La reducción del diámetro de las vesículas se ha correlacionado con el aumento de la acumulación en el tejido afectado, debido al incremento en la extravasación de los liposomas y disminución de la captación por el sistema retículo-endotelial.<sup>9</sup> Por otra parte, el tamaño de los liposomas tiene impacto directo en la inactivación de bacterias y hongos. Partículas pequeñas tienen la ventaja de residir más próximas a los microorganismos, permitiendo que el Fs y las ERO puedan interactuar con la célula patógena y desencadenar su muerte.<sup>10</sup>

Por este motivo, se propone modificar los liposomas convencionales multilamelares obtenidos en el desarrollo de esta Tesis Doctoral, incorporando lípidos PEGilados en su preparación, como así también, controlar el tamaño de estos sistemas mediante la metodología de extrusión.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- 1 Gollmer A, Felgenträger A, Bäuml W, Maisch T, Späth A. A novel set of symmetric methylene blue derivatives exhibits effective bacteria photokilling - a structure-response study. *Photochemical & photobiological sciences* 2015; 14: 335–351.
- 2 Wainwright M, Phoenix DA, Marland J, Wareing DRA, Bolton FJ. A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 1997; 19: 75–80.
- 3 Sperandio FF, Huang Y-Y, Hamblin MR. Antimicrobial Photodynamic Therapy to Kill Gram-negative Bacteria. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2013; 8: 1–23.
- 4 Meerovich GA, Tiganova IG, Makarova EA, Meerovich IG, Romanova M, Tolordova ER et al. Photodynamic inactivation of bacteria and biofilms using cationic bacteriochlorins. *Journal of Physics: Conference Series* 2016; 691: Article ID 012011.
- 5 Ormond AB, Freeman HS. Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials* 2013; 6: 817–840.
- 6 Nag OK, Awasthi V. Surface engineering of liposomes for stealth behavior. *Pharmaceutics* 2013; 5: 542–569.
- 7 Muehlmann LA, Joanitti GA, Silva JR, Longo JPF, Azevedo RB. Liposomal photosensitizers: Potential platforms for anticancer photodynamic therapy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2011; 44: 729–737.
- 8 Deshpande PP, Biswas S, Torchilin VP. Current trends in the use of liposomes for tumor

- targeting. *Nanomedicine (Lond)* 2013; 8: 1–32.
- 9 Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, Wu SY, Sood AK, Hua S. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Frontiers in Pharmacology* 2015; 6: 1–13.
- 10 Chen C-P, Chen C-T, Tsai T. Chitosan nanoparticles for antimicrobial photodynamic inactivation: characterization and in vitro investigation. *Photochemistry and photobiology* 2012; 88: 570–576.

## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

---

### **PUBLICACIONES EN REVISTAS INTERNACIONALES**

- ✓ Jimena Vara, Cristina S. Ortiz. Thiazine dyes: evaluation of monomeric and aggregate forms. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2016; 166: 112–20.

### EN REDACCIÓN

- ✓ Jimena Vara, Sonia G Bertolitti, Cristina Ortiz. Effect of Aggregation of Phenothiazine Dyes on their Singlet Oxygen Quantum Yield.
- ✓ Jimena Vara, María A Perillo, Cristina S. Ortiz. Delivery of phenothiazine photosensitizer by liposome vehicles: preparation and evaluation of their photodynamic properties.

### PROCEEDING

- ✓ Vara Jimena y Ortiz Cristina. Aggregation Thiazine dyes over Singlet Oxygen quantum yield. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 56-57 (2015) Conference Proceeding "3rd International Meeting on Pharmaceutical Sciences, 18-19 September, 2014 Córdoba, Argentina" Available online at [www.ijpsr.com](http://www.ijpsr.com). (E-ISSN: 0975-8232, P-ISSN: 2320-5148)

### **PREMIO INTERNACIONAL**

**Primera distinción I&D:** "Estudio de agregación de colorantes tiazínicos." Vara Jimena, Ortiz Cristina. XXI Congreso de la Federación Panamericana de Farmacia, XVI de la Federación Farmacéutica Sudamericana y XXI Farmacéutico Argentino: *"Por la Salud del Paciente: El Farmacéutico Garante de la calidad y el uso racional del medicamento*. Salta. 03-05 de Septiembre de 2013.

## **PRESENTACIONES A CONGRESOS**

### INTERNACIONALES

- ✓ "Localización de Tiazinas en liposomas." Jimena Vara, Julieta M Sánchez, María A Perillo y Cristina S Ortiz. VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas (COIFFA). XLVII Reunión anual de la Sociedad Argentina Farmacología Experimental (SAFE). III Congreso Sudamericano de Biofarmacia Y Farmacocinética (BFFC). 4 al 6 de noviembre de 2015. Universidad Nacional de Córdoba - Córdoba Argentina.
- ✓ "Liposomas en el desarrollo de Fotosensibilizadores de tercera generación." Jimena Vara, María A Perillo y Cristina S Ortiz. VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas (COIFFA). XLVII Reunión anual de la Sociedad Argentina Farmacología Experimental (SAFE). III Congreso Sudamericano de Biofarmacia Y Farmacocinética (BFFC). 4 al 6 de noviembre de 2015. Universidad Nacional de Córdoba - Córdoba Argentina.
- ✓ "Aggregation effect of Thiazine dyes over Singlet Oxygen quantum yield." Vara Jimena y Ortiz Cristina. Tercera Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa 2014). Córdoba. 18-19 de Septiembre de 2014.
- ✓ "Estudio de agregación de colorantes tiazínicos." Vara Jimena, Ortiz Cristina. XXI Congreso de la Federación Panamericana de Farmacia, XVI de la Federación Farmacéutica Sudamericana y XXI Farmacéutico Argentino: *"Por la Salud del Paciente: El Farmacéutico Garante de la calidad y el uso racional del medicamento.* Salta. 03-05 de Septiembre de 2013.
- ✓ "Estudio de estabilidad química y fotoquímica de nuevos fotosensibilizadores." Vara Jimena, Ortiz Cristina. XXI Congreso de la Federación Panamericana de Farmacia, XVI de la Federación Farmacéutica Sudamericana y XXI Farmacéutico Argentino: *"Por la Salud del Paciente: El Farmacéutico Garante de la calidad y el uso racional del medicamento.* Salta. 03-05 de Septiembre de 2013.
- ✓ "Desarrollo de un fotosensibilizador de segunda generación: halogenación de New Fuchsin". Jimena Vara, Cristina S. Ortiz. Segunda Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFA). Santa Fé, Argentina. 22-23 de Noviembre de 2012.

## NACIONALES

- ✓ “Efecto de la vehiculización en liposomas sobre las propiedades fotoquímicas de fotosensibilizadores”. Jimena Vara, María S Gualdesi y Cristina S Ortiz. Tercera Reunión de Fotobiólogos Moleculares Argentinos. Grupo Argentino de Fotobiología (GRAFOB). Tucumán, Argentina. 29-31 de Agosto de 2016.
- ✓ “Estudio de agregación de Fotosensibilizadores de Segunda Generación”. Jimena Vara, María N. Montes de Oca y Cristina S. Ortiz. XVIII Simposio Nacional de Química Orgánica (SAIQO). Córdoba, Argentina. 13 - 16 de Noviembre de 2011.
- ✓ “Desarrollo de Fotosensibilizadores de Segunda Generación: Halogenación de Azure B”. Jimena Vara, M. Noel Urrutia, M. Noel Montes de Oca y Cristina Ortiz. XXVIII Congreso Argentino de Química y 4to. Workshop de Química Medicinal. 13 y 16 de Septiembre de 2010. Lanús. Buenos Aires.