

Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Nacional de Córdoba  
Tesis Doctoral

---

Zn-Ftalocianinas: Síntesis, caracterización  
y vehiculización en vesículas liposomales.  
Aplicaciones como fotosensibilizadores en  
terapia fotodinámica.

---

Farmacéutica Mariana Miretti

Departamento de Química Orgánica  
Instituto de Investigación en Fisicoquímica de Córdoba

-2020-



---

# Comisión de Tesis

---

## **Director de Tesis:**

Dr. Tempesti, Tomas C.

Dpto. de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC

## **Miembros de tribunal:**

Dra. Baumgartner, María Teresa

Dpto. de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC

Dr. Burgos Paci, Maximiliano

Dpto. de Fisicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC

Dra. Ortiz, Cristina

Dpto. de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas, UNC

## **Evaluador externo:**

Dra. Yslas, Inés

Dpto. de biología molecular, Facultad de Cs Exactas, Físico-Químicas y Naturales,  
Universidad Nacional de Rio Cuarto



*·La vida es eso,  
Continuar el viaje,  
Perseguir tus sueños,  
Destruir el tiempo,  
Correr los escombros,  
Y destapar el cielo·*

*Mario Benedetti*



*A Italo y Marisa*





*“Somos la suma de todos los momentos que hemos experimentado con todas las personas que hemos conocido”*

**...Muchas Gracias...**

*...A las instituciones que me dieron el espacio y la financiación para de desarrollar esta tesis: FCQ-UNC, INFIQC, CONICET, Foncyt, Secyt.*

*...A la comisión evaluadora Tere, Cristina y Maximiliano, gracias por la dedicación y todas las sugerencias, aportes y consejos durante el desarrollo de esta tesis doctoral, por el tiempo y la predisposición en todo momento. A Inés, evaluadora externa, por su tiempo y los aportes en esta última etapa.*

*...Tomi, gracias! Gracias por confiar en mí, por darme el lugar, por aceptarme como tesista, por la paciencia, por guiarme, por enseñarme, por estar siempre, por todos estos años hermosos que compartimos.*

*...Tere, gracias por TODO. Por darme un espacio cuando llegué, por guiarme, por enseñarme, por las horas y horas que me dedicaste, por la paciencia, por ayudarme siempre en todo lo que necesité. Por nuestras largas charlas y consejos, académicos y los de la VIDA.*

*...A mis compañeros de laboratorio, a los que estuvieron un tiempito (Javi y Patri) y especialmente a los que están: Lea, Daf, Paty, Noe, Charly, Lili, Marce, Tomi y Tere GRACIAS!! Por TODO, por la ayuda que me brindaron cada vez que necesité, por hacer más liviana la tarea diaria, por hacer del lugar de trabajo (donde uno pasa muuuchas horas) un lugar en donde me guste estar. Por las risas (diarias), por las juntadas, por los after lab, por hacer de cualquier situación un buen momento para brindar, merendar, almorzar, etc. GRACIAS INFINITAS!!*

...A Tincho, Mica Gabi y Cin con quienes compartí y sigo compartiendo hermosos momentos!! Gracias por todo eso!

...A César, un gran amigo, quién además de bancarme emocionalmente, fue de quien aprendí muchísimo. Cada discusión de resultados, búsqueda bibliográfica y diseño de experimentos tuvo sentido. Gracias por enseñarme, por la paciencia, por todos estos años de investigación hermosos y por estar SIEMPRE. Muchas muchas gracias.

...A Patri con quién comparto una amistad hermosa, quien estuvo durante mis primeros años en la facu y me ayudó un montón. Y quien sigue estando siempre.

...A mis dos ayudantes, Anto y Nacho por enseñarme a enseñar. Por seguir eligiendo trabajar conmigo, por la paciencia, y dedicación.

...A las personas del departamento de Química Orgánica con quienes de alguna forma u otra he compartido momentos, equipos, docencia, congresos y charlas de pasillo y a quienes me han brindado su ayuda, GRACIAS!

...A los compañeros de viajes...

...A Leti, Cristina y Romina por las colaboraciones.

...A los secretarios, a Raúl y al personal de apoyo del INFIQC.

...A Guille, sin su insistencia no estaría doctorándome. En donde sea que estés, GRACIAS!! Por confiar en mí y por dejarme en MUY buenas manos.

...A David, gracias por bancarme en todas y por estar SIEMPRE. Gracias por apoyarme en todo lo que decido, por ayudarme, por escucharme, por ser mi compañero, mi sostén.

...A mi gran familia, mi gran sostén, GRACIAS! A mis viejos, Italo y Marisa, por apoyarme desde el primer momento, aunque al principio no sabían bien de que se trataba todo esto... Nada de lo que logré lo hubiese hecho sin ustedes, sin el amor constante y el apoyo que siempre me dan. A mis hermanos Dani, Fer y Tebi, son quienes me acompañan y me bancan siempre. Con quienes comparto la vida y sobre todo un amor inconmensurable.

...A Mar, Lu, Bren, Ema, Martín, Nina y Pauli por llenar mi vida de amor y ternura.

...A Nora y Ricardo, por estar siempre presentes y pendientes de mis cosas.

...Sele, mi gran amiga, quien me apoyó desde el primer momento en que decidí seguir este camino y me acompaña en TODO desde que éramos muy chiquitas.

...A Mayra, por acompañarme y estar siempre.

...A Dani y a Eve por la gran amistad que nos une más allá de la distancia y el tiempo.

...A mis amigas de siempre, Melina, Melisa, Jesi, Gabi y Flopy.



---

# Resumen

---

La terapia fotodinámica ha surgido como una alternativa eficaz para, el tratamiento de diversas patologías, entre ellas, varios tipos de cáncer e infecciones microbianas. Este tipo de terapia implica la acción de tres componentes: un fotosensibilizador, luz, y la presencia de oxígeno. Cuando el fotosensibilizador es excitado por la luz, genera especies reactivas de oxígeno, entre ellas oxígeno singlete, que son capaces de reaccionar con componentes celulares generando daño celular. La principal ventaja de esta terapia es que el daño se limita a la zona irradiada.

En esta tesis, se realizó la síntesis de ftalocianinas, un tipo de fotosensibilizador de segunda generación, y se evaluó su actividad *in vitro* en terapia fotodinámica y terapia fotodinámica antimicrobiana. Con el fin de obtener ftalocianinas con diversidad estructural y de cargas, se partió desde la síntesis de sus precursores, ftalonitrilos y subftalocianinas. Se obtuvieron 12 ftalocianinas diferentes, dos de ellas catiónicas. Los resultados de la síntesis y de la caracterización por resonancia magnética nuclear, se muestran en el Capítulo 2. El Capítulo 3, contiene la caracterización a través de espectrofotometría de absorción y de fluorescencia de las ftalocianinas sintetizadas previamente.

Las pruebas *in vitro* en terapia fotodinámica antimicrobiana y terapia fotodinámica se exponen en el Capítulo 4 y 5 respectivamente. En el Capítulo 4 se evalúa la actividad de tres ftalocianinas, dos catiónicas y una neutra, en dos bacterias Gram-negativas, una de ellas con multi resistencia a antibióticos convencionales y la otra sensible. Encontrándose una mayor actividad con las ftalocianinas catiónicas para ambas cepas. En el Capítulo 5 se muestran los resultados obtenidos con dos fotosensibilizadores en células de glioblastoma T98G, encontrándose ambos compuestos activos generando una reducción de la viabilidad celular de aproximadamente 90% y desencadenando apoptosis como principal mecanismo de muerte celular.

Dos de las ftalocianinas sintetizadas, se vehiculizaron en liposomas. El Capítulo 6, contiene la síntesis y caracterización de liposomas como *carriers* de las ftalocianinas. La caracterización consta de espectrofotometría de absorción y fluorescencia, tamaño

promedio y porcentaje de encapsulación. Además, se realizaron ensayos de estabilidad a corto y largo plazo, y de localización de la ftalocianina dentro del liposoma.

Para finalizar, en el Capítulo 7 se desarrollan las pruebas *in vitro* realizadas utilizando ftalocianinas vehiculizadas en liposomas. En la primera parte del capítulo se muestran los ensayos correspondientes a los realizados en células de glioblastoma T98G utilizando las dos ftalocianinas vehiculizadas, mostrando una mejora en la efectividad de la terapia fotodinámica respecto a los resultados obtenidos en el Capítulo 5. En la segunda parte del capítulo se muestran los resultados correspondientes a los ensayos en bacterias *Mycobacterium tuberculosis*, una de ellas con resistencia a los fármacos de primera línea de elección para los tratamientos de tuberculosis. Mostrando una actividad del 99,9% en la cepa multirresistente utilizando condiciones mucho más drásticas que las necesarias para generar el mismo porcentaje de muerte en la cepa sensible.

---

# Abreviaturas

---



5-ALA	Ácido 5-aminolevulínico
AST	Test de susceptibilidad antimicrobiana
BSA	Albúmina de suero bovino
CIM	Concentración mínima inhibitoria
CLSI	Clinical and laboratory standards institute
col	Colesterol
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DLS	Dispersión Dinámica de la luz
DMA	9,10-dimetilantraceno
DMAE	N,N-dimetilaminoetanol
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMF	N,N-dimetilformamida
DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBF	1,3-difenilisobenzofurano
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Eficiencia de la encapsulación
EI	Impacto electrónico
FDA	Food and drug administration
GUV	Vesículas unilamelares gigantes
Hp	Hematoporfirina
HpD	Derivado de hematoporfirina
INEI	Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas
INH	Isoniazida
IP	Índice de polidispersidad
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> productora de carbapenemasas
LUV	Vesículas unilamelares grandes
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MAdTNZnPc	Zinc(II)4-(adamantiletoxi)-trinitroftalocianina
MAZnPc	Zinc(II)monoaminoftalocianina
MDIATriNZnPc	Zinc(II)4-(2,6-diisopropil-1-amino-fenil)-trinitroftalocianina

MDR- <i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> multiresistente
MDR-TB	Tuberculosis multiresistente
MLV	Vesículas multilamelares
MNZnPc	Zinc(II)mononitroftalocianina
MTPZnPc	Zinc(II)monotio2-piridinftalocianina
MVV	Vesículas multivesiculares
mw	Microondas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer fosfato salino
PC	Fosfatidilcolina
Pc	Ftalocianina
Pcs	Ftalocianinas
PEG	Polietilenglicol
PI	Ioduro de propidio
PM	Peso molecular
PS	Fotosensibilizador
PSs	Fotosensibilizadores
RIF	Rifampicina
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFB	Suero fetal bovino
SRE	Sistema reticuloendotelial
SubPc	Subftalocianina
SUV	Vesículas unilamelares pequeñas
TAZnPc	Zinc(II)tetraaminoftalocianina
TB	Tuberculosis
TEM	Microscopia de transmisión electrónica
TFD	Terapia fotodinámica
TFDA	Terapia fotodinámica antimicrobiana
THF	Tetrahidrofurano
TMAZnPc	Zinc(II)tetra(N,N,N-trimetilamino)ftalocianina
TNZnPc	Zn(II)tetranitroftalocianina
TPySZnPc	Zinc(II) tetra-4-(piridil-2-tio)ftalocianina
TriNSubPc	Tri-nitro-subftalocianina
TSB	Caldo de tripteina de soja
UFC	Unidades formadoras de colonias
Zn <sub>2</sub> ,3PyPz	Zinc(II)-2,3-piridinporfirazina
ZnAc	Acetato de Zinc
ZnPc	Zinc(II)ftalocianina
ZnTM <sub>2</sub> ,3PyPz	Zinc(II)tetrametil-2,3-piridinporfirazina



---

# Índice general

---

Resumen.....	xiii
Abreviaturas.....	xv
Índice General.....	xvii
Capítulo 1. Introducción General.....	1
1.1    Terapia Fotodinámica .....	3
1.1.1    Historia de la terapia fotodinámica.....	3
1.1.2    Mecanismos fotofísicos y fotoquímicos de la terapia fotodinámica.....	6
1.1.3    Fuente de luz.....	8
1.2    Fotosensibilizadores .....	8
1.2.1    Fotosensibilizadores no porfirínicos .....	10
1.2.2    Fotosensibilizadores porfirínicos.....	12
1.2.3    Transportadores más frecuentes para fotosensibilizadores de tercera generación.....	17
1.3    Aplicaciones de fotosensibilizadores en terapia fotodinámica.....	19
1.4    Ftalocianinas.....	21
1.5    Objetivo general.....	25
1.5.1    Objetivos específicos.....	25
1.6    Bibliografía.....	26
Capítulo 2. Síntesis y caracterización de ftalocianinas.....	35
2.1    Introducción.....	37
2.2    Objetivos.....	41

2.3	Resultados y discusión .....	43
2.3.1	Síntesis de ftalonitrilos sustituidos.....	43
2.3.2	Síntesis de subftalocianinas (SubPc).....	45
2.3.3	Síntesis de ftalocianinas.....	46
2.4	Conclusiones.....	51
2.5	Sección experimental.....	53
2.5.1	Equipamiento.....	53
2.5.2	Reactivos.....	54
2.5.3	Modificación de ftalonitrilos.....	54
2.5.4	Síntesis de subftalocianinas (SubPc).....	56
2.5.5	Síntesis de ftalocianinas.....	57
2.6	Bibliografía.....	60
Capítulo 3. Ftalocianinas: caracterización por espectroscopía de absorción y de fluorescencia.....		63
3.1	Introducción.....	65
3.2	Objetivos.....	69
3.3	Resultados y discusión .....	70
3.3.1	Caracterización espectroscópica por UV-vis.....	70
3.3.2	Espectroscopía de emisión de fluorescencia.....	74
3.3.3	Rendimiento cuántico de oxígeno singlete.....	75
3.4	Conclusiones.....	77
3.5	Sección experimental.....	78
3.5.1	Equipamiento.....	78
3.5.2	Espectroscopía de absorción.....	78
3.5.3	Espectroscopía de emisión de fluorescencia.....	78
3.5.4	Determinación del rendimiento cuántico de oxígeno singlete .....	79
3.6	Bibliografía.....	80

Capítulo 4. Aplicación de Zn-ftalocianinas en Terapia Fotodinámica Antimicrobiana <i>in vitro</i> .....	83
4.1    Introducción.....	85
4.2    Objetivos.....	88
4.3    Resultados y discusión.....	90
4.3.1    Experimentos control de terapia fotodinámica antimicrobiana <i>in vitro</i> .....	91
4.3.2    Ensayos de Terapia Fotodinámica Antimicrobiana.....	92
4.3.3    Microscopía de transmisión electrónica en KPC.....	96
4.3.4    Concentración mínima inhibitoria (CIM).....	96
4.4    Conclusiones.....	97
4.5    Sección experimental.....	98
4.5.1    Fotosensibilizadores.....	98
4.5.2    Fuente de luz.....	98
4.5.3    Cepas y condiciones de cultivo bacteriano.....	98
4.5.4    Inactivación fotodinámica <i>in vitro</i> .....	99
4.5.5    Microscopía de transmisión electrónica.....	100
4.5.6    Determinación de la concentración inhibitoria mínima.....	100
4.6    Bibliografía.....	101
Capítulo 5. Aplicación <i>in vitro</i> de ftalocianinas en Terapia Fotodinámica en células de glioblastoma.....	105
5.1    Introducción.....	107
5.2    Objetivos.....	109
5.3    Resultados y discusión.....	110
5.3.1    Fotosensibilizadores.....	110
5.3.2    Citotoxicidad en oscuridad de los fotosensibilizadores.....	110
5.3.3    Incorporación intracelular de Pcs.....	111
5.3.4    Localización subcelular.....	112
5.3.5    Fotocitotoxicidad.....	113

5.3.6	Ensayos clonogénicos.....	114
5.3.7	Modo de muerte celular desencadenado por terapia fotodinámica. ....	115
5.3.8	Fotocitotoxicidad en otras células de glioma. ....	118
5.4	Conclusiones.....	119
5.5	Sección experimental.....	121
5.5.1	Fotosensibilizadores .....	121
5.5.2	Fuente de luz.....	121
5.5.3	Condiciones de cultivo celular .....	121
5.5.4	Determinación de viabilidad celular .....	121
5.5.5	Localización subcelular de PS.....	122
5.5.6	Incorporación intracelular de Pcs.....	122
5.5.7	Citotoxicidad en oscuridad .....	123
5.5.8	Fotocitotoxicidad.....	123
5.5.9	Ensayo clonogénico .....	123
5.5.10	Inmunodetección de caspasa 3 clivada.....	124
5.5.11	Detección de apoptosis y necrosis: tinción de anexina V – Ioduro de propidio.....	124
5.6	Bibliografía.....	125
Capítulo 6. Fotosensibilizadores de 3º generación: Ftalocianinas vehiculizadas en liposomas. Síntesis y caracterización.....129		
6.1	Introducción.....	131
6.2	Objetivos.....	135
6.3	Resultados y discusión .....	136
6.3.1	Fotosensibilizadores .....	136
6.3.2	Síntesis de liposomas .....	136
6.3.3	Caracterización liposomal.....	137
6.3.4	Estabilidad a corto plazo .....	140
6.3.5	Estabilidad a largo plazo.....	140

6.3.6	Localización de las Pcs en el liposoma .....	141
6.3.7	Propiedades fotofísicas en medio de cultivo .....	144
6.4	Conclusiones.....	146
6.5	Sección experimental.....	147
6.5.1	Equipamiento para espectroscopía .....	147
6.5.2	Fotosensibilizadores .....	147
6.5.3	Síntesis de liposomas .....	147
6.5.4	Caracterización de liposomas.....	147
6.5.5	Estabilidad a corto plazo .....	148
6.5.6	Estabilidad a largo plazo.....	149
6.5.7	Localización de las Pcs en los liposomas.....	149
6.5.8	Propiedades fotofísicas en medio de cultivo .....	149
6.6	Bibliografía.....	150
Capítulo 7. Aplicaciones de fotosensibilizadores de 3º generación. Ensayos <i>in vitro</i> en terapia fotodinámica y terapia fotodinámica antimicrobiana.....		
		153
7.1	Introducción.....	155
7.2	Objetivos.....	157
7.3	Resultados y discusión.....	158
7.3.1	Pruebas <i>in vitro</i> en Células de glioblastoma.....	158
7.3.2	Pruebas <i>in vitro</i> en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	162
7.4	Conclusiones.....	168
7.5	Materiales y Métodos.....	170
7.5.1	Pruebas <i>in vitro</i> en Células de glioblastoma.....	170
7.5.2	Pruebas <i>in vitro</i> en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	171
7.6	Bibliografía.....	174
Capítulo 8. Conclusiones generales, proyecciones y producción científica.....		
		177

8.1	Conclusiones Generales .....	179
8.2	Proyecciones.....	183
8.3	Producción Científica.....	184

---

# Capítulo 1

---

## Introducción general

1.1	Terapia Fotodinámica .....	3
1.1.1	Historia de la terapia fotodinámica .....	3
1.1.2	Mecanismos fotofísicos y fotoquímicos de la terapia fotodinámica .....	6
1.1.3	Fuente de luz .....	8
1.2	Fotosensibilizadores .....	8
1.2.1	Fotosensibilizadores no porfirínicos .....	10
1.2.2	Fotosensibilizadores porfirínicos .....	12
1.2.3	Transportadores más frecuentes para fotosensibilizadores de tercera generación.	17
1.3	Aplicaciones de fotosensibilizadores en terapia fotodinámica .....	19
1.4	Ftalocianinas .....	21
1.5	Objetivo general.....	25
1.5.1	Objetivos específicos.....	25
1.6	Bibliografía.....	26





## 1.1 Terapia Fotodinámica

La terapia fotodinámica (TFD) es una estrategia terapéutica para tratar diversas enfermedades y consiste en la aplicación de un fotosensibilizador (PS), un compuesto capaz de absorber la energía de la luz y transferir esa energía a las moléculas adyacentes, en presencia de luz y oxígeno. Estos tres componentes deben ser inocuos por separado, pero cuando se combinan, producen especies reactivas capaces de generar daño celular.<sup>1</sup> En las últimas décadas, la TFD ha ganado cada vez mayor atención en aplicaciones clínicas para el tratamiento de diversos tipos de tumores sólidos, como de piel, esófago, pulmón, vejiga, próstata, cerebro, cabeza y cuello, huesos, cuello uterino y carcinomas de ovario.<sup>2</sup> La principal ventaja de la TFD es que el daño se limita al tejido circundante al sitio irradiado y por lo tanto minimiza los posibles efectos secundarios.<sup>3</sup>

### 1.1.1 Historia de la terapia fotodinámica

La luz se ha utilizado como terapia durante más de tres mil años.<sup>4,5</sup> La fototerapia (origen de la TFD), emplea luz, con o sin PS. Cuando no se aplica un PS, la fototerapia se emplea principalmente en dermatología para tratar la deficiencia de vitamina D, ictericia neonatal, psoriasis, eczema, vitiligo, linfoma cutáneo de células T, entre otras.<sup>6,7</sup> La historia de la fotomedicina se remonta a la antigüedad cuando se trataban enfermedades de la piel con compuestos extraídos de plantas que al exponerse a luz solar, demostraban efectos terapéuticos específicos. Las antiguas civilizaciones egipcias, indias y chinas usaban la luz para tratar diversas enfermedades, como la psoriasis, el raquitismo, el vitiligo y el cáncer de piel.<sup>8</sup>

En 1900 Prime, un neurólogo francés que administraba eosina por vía oral para el tratamiento de la epilepsia en humanos, observó además de los efectos neurológicos, que las regiones de la piel expuestas a la luz solar desarrollaban un eritema severo.<sup>9</sup> En el mismo año, el estudiante de medicina alemán Oscar Raab, bajo la supervisión del profesor Herman Von Tappeiner, observaron que los paramecios, organismos unicelulares del reino protista, al estar en contacto con acridina, morían en presencia de la luz solar, pero si los mantenía en la oscuridad los mismos sobrevivían.<sup>10</sup> En 1901, Niels Finsen, un médico danés, publicó el primer libro sobre el tratamiento de enfermedades con luz titulado "La Fototerapia". Los métodos y herramientas desarrollados por Finsen demostraron ser muy efectivos para tratar infecciones de la piel, entre ellos la tuberculosis cutánea.<sup>11</sup> En 1903, Von Tappeiner y

A. Jesionek trataron tumores de piel con eosina aplicada tópicamente y luz blanca.<sup>12</sup> Años más tarde, demostraron que la toxicidad celular requería la combinación de un compuesto (fotosensibilizador), luz y oxígeno; a este fenómeno lo describieron como "*acción fotodinámica*".<sup>8,13</sup> A pesar de los resultados prometedores que estaban obteniendo, TFD se abandonó porque se descubrió que los PS que usaban (compuestos como la acridina) eran demasiado tóxicos y presentaban un alto potencial oncogénico.<sup>14,15</sup>

En 1911, Hausmann demostró la capacidad de destruir la vasculatura tumoral en ratones después de la acción combinada de administración de hematoporfirina (Hp) y la exposición a la luz solar. A diferencia de la eosina y las acridinas, las porfirinas no eran tóxicas en ausencia de luz.<sup>16</sup> En 1913, Friedrich Meyer-Betz se inyectó 200 mg de Hp y permaneció bajo la luz solar durante unos minutos. No se notaron efectos relacionados con el fotosensibilizador antes de la exposición a la luz solar; sin embargo, al exponerse al sol, su piel se hinchó extremadamente y las reacciones fueron observables durante meses.<sup>17</sup>

Años más tarde, varios investigadores detectaron fluorescencia emitida por tumores después de la administración intravenosa de porfirinas, seguida de iluminación; observando que los tumores acumulaban más hematoporfirina que los tejidos sanos.<sup>18,19</sup> Este hecho, mostró las capacidades de diagnóstico por fluorescencia de la hematoporfirina que años más tarde se continuó investigando.

En la década del 60, Lipson y colaboradores iniciaron estudios en TFD utilizando un compuesto desarrollado previamente por Schwartz llamado "derivado de hematoporfirina" (HpD).<sup>20</sup> Demostraron la acumulación preferencial de HpD en tumores y desarrollaron muchos estudios diseñados para detectar tumores mediante detección endoscópica de fluorescencia.<sup>21</sup> En 1972, Diamond y sus colaboradores postularon que la combinación de las propiedades de localización tumoral y fototóxica de las porfirinas podría emplearse con el fin de provocar la muerte de las células cancerosas.<sup>22</sup> Los estudios *in vivo* revelaron que la TFD retrasó el crecimiento de los gliomas implantados en ratas.<sup>8</sup> En la misma década, Thomas Dougherty inició una serie de ensayos clínicos de TFD contra el cáncer utilizando HpD y luz roja.<sup>23</sup> En 1987, Malik y Lugaci demostraron que la aplicación exógena de otro PS, 5-ácidoaminolevulínico (5-ALA) con luz roja resultó en una destrucción de las células eritroleucémicas por la síntesis endógena de protoporfirina IX.<sup>24</sup>

Como resultado del éxito de HpD y 5-ALA en la década de 1980, varias agencias reguladoras médicas aprobaron el uso de PSs para pruebas clínicas. En 1993, HpD, comercializado como Photofrin<sup>®</sup>, fue aprobado para el tratamiento del cáncer de vejiga en

Canadá. Años más tarde, se aprobó en Europa y Japón para TFD en cáncer de esófago, gástrico, cervical y de pulmón.<sup>25</sup> En 1995 fue aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) en EEUU para el tratamiento de cáncer de esófago, en 1998 para estadios tempranos de cáncer de pulmón y en 2003 para esófago de Barret.<sup>1</sup> En 1999, la FDA aprobó Levulan Kerastick® (un ungüento tópico de 5-ALA) para el tratamiento de lesiones de piel precancerosas y cancerosas. Además de la aprobación de TFD, para el tratamiento de afecciones neoplásicas, la FDA ha aprobado varios PSs, incluido Visudyne®, una preparación de verteporfin, para el tratamiento de enfermedades oftalmológicas, incluida la degeneración macular relacionada con la edad (AMD). Para 2005, Visudyne® había sido aprobado para el tratamiento de AMD y para varias enfermedades caracterizadas por hiperproliferación en más de 50 países. En 2001, Foscan® fue aprobado por la Agencia Médica Europea (EMA) para el tratamiento de cánceres de cabeza y cuello. Además del Photofrin®, otros HpD se comercializan como Photogem® aprobado para uso clínico en Rusia y Brasil,<sup>26</sup> y Photosan® aprobado por la Unión Europea (UE).<sup>7,27</sup>

Desde 1900 a 1990, se publicaron solo algunos artículos sobre el potencial microbiológico de la TFD.<sup>28,29</sup> La terapia fotodinámica antimicrobiana (TFDA) comenzó a tener mayor auge en los años 1990 y 2000 como consecuencia del éxito de la TFD anticancerígena y por la aparición de la resistencia a los antimicrobianos en la segunda mitad del siglo pasado y la necesidad urgente de alternativas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades infecciosas.<sup>1,15</sup>

En Argentina, actualmente existen cinco PSs autorizados por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) para tratar diversas patologías con TFD: Photofrin®, Levulan®, Vysudine®, Foscan® y Metvix®. En la Tabla 1 se muestran los PSs aprobados y comercializados en Argentina.

Tabla 1. Fotosensibilizadores comercializados y aprobados por ANMAT en Argentina

Fotosensibilizador	Forma Farmacéutica	Laboratorio que lo comercializa
Photofrin®, porfímero sódico <sup>30</sup>	Polvo liofilizado para inyectable (subcutáneo)	Techsphere de Argentina S.A.
Levulan®, clorhidrato de ácido aminolevulinico/levulan kerastick <sup>31</sup>	Solución tópica dérmica	Stiefel Argentina S.A.
Vysudine®, veteporfin <sup>32</sup>	Polvo para reconstituir, inyectable (intravenoso)	Novartis Argentina S.A.
Foscan®, temoporfin <sup>33</sup>	Solución inyectable	Gen Med International L.L.C.
Metvix®, aminolevulinato <sup>34</sup>	Pomada - crema dérmica	Galderma Argentina S.A.

### 1.1.2 Mecanismos fotofísicos y fotoquímicos de la terapia fotodinámica

Los procesos involucrados en TFD se ilustran en el diagrama de Jablonski, en la Figura 1.

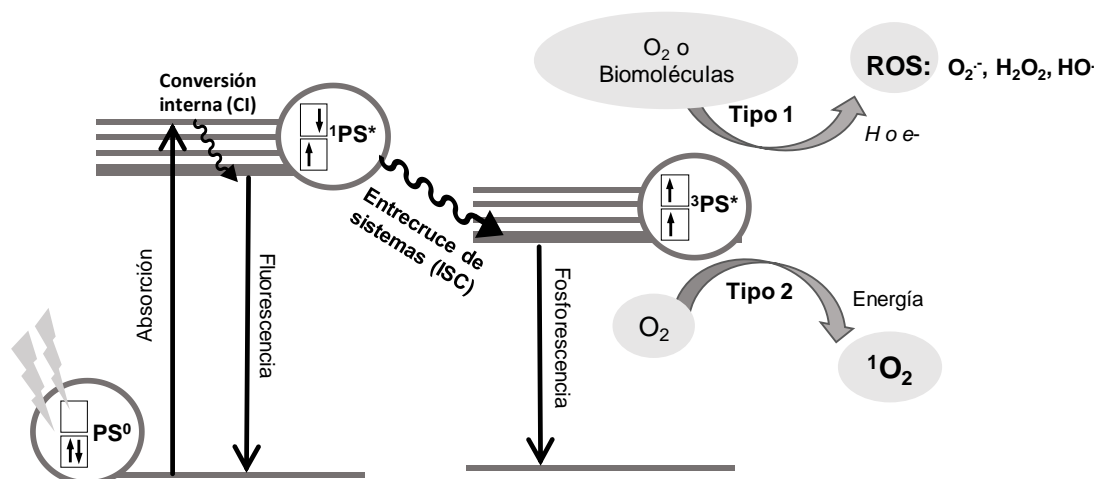


Figura 1. Diagrama de Jablonski modificado con los procesos involucrados en TFD

Cuando un fotosensibilizador en estado fundamental (o basal)  $PS^0$  absorbe energía, puede promover un electrón de la capa de valencia desde el orbital molecular ocupado más alto (HOMO) hasta el orbital molecular desocupado más bajo (LUMO), es decir, pasar de un estado basal a un estado excitado ( $PS^0 \rightarrow PS^*$ ). Las moléculas en estado excitado generalmente son inestables con una vida útil muy corta y pueden volver rápidamente a su estado fundamental ( $PS^* \rightarrow PS^0$ ) a través de varios procesos de desactivación posibles.<sup>15</sup>

La desactivación radiativa del estado singlete excitado al estado fundamental ( $^1PS^* \rightarrow PS^0$ ) es a través de fluorescencia. Las transiciones de conversión interna (CI) no son radiativas, pero difieren del entrecruzamiento de sistemas (ISC por sus siglas en inglés Inter System Crossing) porque mantienen el espín y son extremadamente rápidas. Las transiciones no radiativas pueden disipar parte de la energía inicialmente absorbida, por lo que los fotones emitidos por fluorescencia tienen una energía menor (longitud de onda más larga) que el fotón absorbido.<sup>15</sup>

Alternativamente, un electrón de estado singlete excitado puede experimentar inversión de espín y poblar el primer estado triplete excitado de menor energía ( $^1PS^* \rightarrow ^3PS^*$ ) a través del ISC, proceso no radiativo, prohibido por espín, ya que el espín del electrón no se conserva. Así, tras la absorción de un fotón se genera un PS excitado de corto tiempo

de vida en el estado singlete, que se convierte en un estado triplete de mayor duración después del ISC. El electrón excitado, puede entonces sufrir una segunda inversión prohibida de espín y depoblar el estado triplete excitado al decaer al estado fundamental mediante fosforescencia  ${}^3\text{PS}^* \rightarrow \text{PS}^0$ . Debido a la transición de triplete a singlete prohibida por espín, la vida media de la fosforescencia es considerablemente más larga que la de la fluorescencia.<sup>1,3</sup>

El  ${}^3\text{PS}^*$  excitado, además, puede desactivarse o extinguirse mediante la donación de cargas o energía a otras moléculas, lo que se denomina reacción fotoquímica tipo I y tipo II, respectivamente. Las reacciones fotoquímicas tipo I implican reacciones de transferencia de hidrógeno o electrones desde el estado triplete excitado del  ${}^3\text{PS}^*$  a moléculas biológicas u oxígeno. Estas reacciones de transferencia de electrones producen (directa o indirectamente) especies reactivas de oxígeno (ROS) que son dañinas para las células (Ver Figura 1), como el superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), los radicales hidroxilo ( $\text{HO}^{\cdot}$ ) y los radicales hidroperoxilo ( $\text{HOO}^{\cdot}$ ).<sup>35,36</sup> Se sabe que las ROS inician una gran cantidad de reacciones. Un solo radical formado puede iniciar una reacción en cadena que puede propagarse para dañar varias biomoléculas. Estas reacciones son bastante inespecíficas y pueden atacar lípidos, azúcares, proteínas y ácidos nucleicos formando restos radicales dentro de estas biomoléculas. Como consecuencias directas, las proteínas se desnaturalizan y los polisacáridos se cortan, los ácidos nucleicos se dañan y las membranas se vuelven menos fluidas y más porosas e incluso pueden romperse. Estas interacciones causan daño y destrucción de las membranas celulares y la desactivación enzimática, que culmina en la muerte celular.<sup>3</sup>

En las reacciones de tipo II, se genera oxígeno singlete ( ${}^1\text{O}_2$ ) como resultado de la transferencia de energía del  ${}^3\text{PS}^*$  al estado fundamental del oxígeno molecular. La eficiencia y el rendimiento de la producción de oxígeno singlete dependen directamente de la estructura del fotosensibilizador, la concentración local de oxígeno y el disolvente en el que se diluyen.<sup>15,37,38</sup> Esta especie de oxígeno altamente reactiva juega un papel importante en la activación de la cascada de eventos citotóxicos que resultan en el deterioro de las funciones celulares y la eventual muerte de las células tumorales. El  ${}^1\text{O}_2$  reacciona principalmente con moléculas presentes en el entorno de su formación, que contienen grupos tiol o dobles enlaces insaturados, tales como aminoácidos aromáticos y que contienen azufre, lípidos insaturados, esteroides y nucleótidos. Por lo tanto, muestra un patrón de reactividad más restringido en comparación con los radicales libres producidos por las reacciones de tipo I.<sup>15,38</sup> El tiempo de vida del  ${}^1\text{O}_2$  intracelular es del orden de unos

pocos microsegundos, más corto que el determinado en agua de 3,5  $\mu\text{s}$  y su radio de actividad dentro de la célula de aproximadamente 1–1,5  $\mu\text{m}$ .<sup>37</sup> Estos datos enfatizan el alto grado de selectividad de tiempo y espacio de la TFD, y la importancia de la localización intracelular del PS.<sup>38</sup> Se ha informado que los PSs localizados en las mitocondrias o el retículo endoplásmico inducen apoptosis, mientras que los PSs localizados en la membrana plasmática conducen a la necrosis.<sup>39</sup> Distintos estudios sugieren que las reacciones fotoquímicas tipo II predominan en la inducción del daño celular.<sup>36,40</sup>

### 1.1.3 Fuente de luz

Como se mencionó anteriormente, un PS se excita por acción de la luz, por lo tanto constituye un factor clave a tener en cuenta en TFD. La fuente de luz se debe corresponder con la longitud de onda apropiada para excitar el fotosensibilizador siendo aquella a la que se registra el intervalo de absorción del PS. Se sabe que, a mayores longitudes de onda, la luz penetra más eficientemente en los tejidos, aunque a longitudes de onda superiores a 1300 nm aumenta la absorción del agua. Por otra parte, a longitudes de onda más bajas se produce una mayor dispersión de luz y la absorción por parte de cromóforos endógenos, como la forma reducida del dinucleótido de nicotinamida adenina (NADH), colágeno, lipopigmentos, desoxihemoglobina, flavinas y melanina, resultando en una alta fotosensibilidad.<sup>41,42</sup> Por lo tanto, la máxima permeabilidad del tejido ocurre dentro del rango de aproximadamente 650 a 850 nm. Este rango óptimo a utilizar para irradiar los PS se denomina “ventana fototerapéutica”. Por lo tanto, el PS debe tener preferiblemente intensidades de transición electrónica fuertes en esta “ventana fototerapéutica”, donde se maximiza la penetración de la luz en los tejidos.<sup>36,43</sup>

## 1.2 Fotosensibilizadores

Uno de los tres elementos cruciales de la TFD, además de la luz y el oxígeno, es la presencia de fotosensibilizadores. Estos, se definen como sustancias capaces de absorber luz con una longitud de onda específica, desencadenando reacciones que llevan a procesos de destrucción celular.<sup>2</sup> Las características y condiciones que debe tener un fotosensibilizador ideal son:<sup>2,3,7,36,44,45,46</sup>

- Alta selectividad para los tejidos neoplásicos: capacidad de acumularse preferentemente en el tejido afectado, siendo eliminado rápidamente de los tejidos sanos, minimizando así los efectos secundarios fototóxicos de la terapia.

- Presentar una metodología de síntesis simple, económica y fácil, a partir de precursores disponibles, y fácilmente reproducible.

- Presentar alto grado de pureza química, composición química conocida y estabilidad química y fotoquímica.

- Fuerte absorción con un alto coeficiente de extinción en la región de la ventana fototerapéutica 650–850 nm. Cuanto mayor sea el valor  $\epsilon_{\max}$ , mayor será el posible efecto fotodinámico y menor será la dosis de PS y luz necesaria para una TFD eficiente.

- Las bandas de absorción no deben solaparse con la absorción de otras moléculas presentes en el cuerpo, como melanina, hemoglobina u oxihemoglobina.

- Absorción mínima en el rango de 400 nm a 600 nm, evitando así, posible fotosensibilidad causada por la luz solar.

- Ser generadores efectivos de oxígeno singlete y otras ROS.

- Presentar un gran rendimiento de formación de estado triplete ( $\Phi_T \geq 0,5$ ); un alto rendimiento cuántico de oxígeno singlete ( $\Phi_\Delta \geq 0,5$ ); un tiempo de vida del estado triplete relativamente largo ( $\tau_T$ , rango de microsegundos).

- Mínima o nula citotoxicidad en ausencia de luz y de sus metabolitos.

- Presentar una formulación farmacológica simple y estable.

- Ser solubles en medios biológicos, lo que permite la administración intravenosa directa y el transporte al objetivo deseado. De lo contrario, se debe desarrollar un sistema de suministro hidrofílico que permita el transporte eficiente y efectivo del fotosensibilizador al sitio objetivo a través del torrente sanguíneo.

Estas características dependen del PS en cuestión y la mayoría pueden variarse mediante el diseño y la modificación de su estructura. Los PSs se clasifican generalmente como porfirínicos o no porfirínicos. Los fotosensibilizadores derivados de la porfirina se clasifican además como fotosensibilizadores de primera, segunda o tercera generación.<sup>46</sup> Los PSs de tercera generación corresponden a los de segunda generación vehiculizados con diferentes *carriers*.

En la Figura 2 se presenta un esquema abordando la clasificación de los PSs ejemplificando en cada caso y que posteriormente se desarrollan en los siguientes incisos.

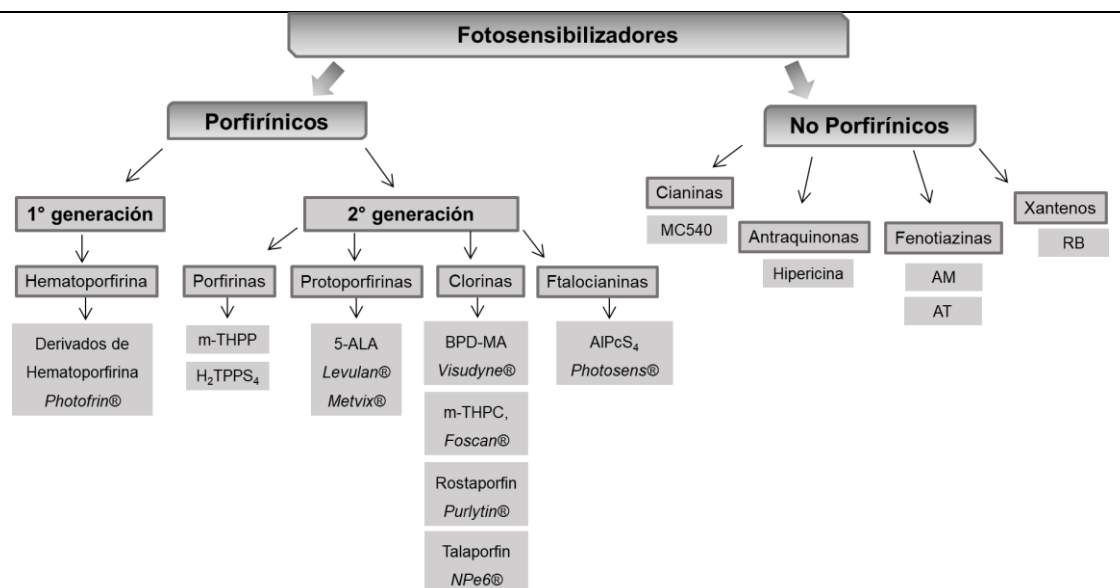


Figura 2. Fotosensibilizadores y su clasificación.

### 1.2.1 Fotosensibilizadores no porfirínicos

Aunque las estructuras porfirínicas comprenden la mayoría de los PSs, varios no porfirínicos exhiben actividad fotodinámica. El desarrollo de PSs no porfirínicos para su aplicación en oncología se ha retrasado considerablemente con respecto a la TFD basada en porfirínicos. Hasta la fecha, los derivados de fenotiazinas, que incluyen azul de metileno (AM) (Figura 3a) y azul de toluidina (AT) (Figura 3b), han sido el foco predominante.<sup>46</sup> Estos compuestos, producen citotoxicidad celular directa, tienen máximos de absorción mayores a 600 nm y coeficientes de extinción molar superiores a  $100000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . El AM, se aplica ampliamente en varias disciplinas de la medicina y es bien conocido por producir oxígeno singlete y destruir ácidos nucleicos. Tiene una absorción máxima a 666 nm y un coeficiente de extinción molar de  $82000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  en soluciones acuosas. El AM inyectado intravenoso tiene una vida media plasmática en humanos de 5,25 h. El AT, tiene un máximo de absorción entre 626 y 632 nm y un coeficiente de extinción molar de  $30000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Después de la activación de la luz, se ha demostrado que el AT elimina numerosos agentes microbianos *in vitro*, incluidos *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina.<sup>7,46</sup>



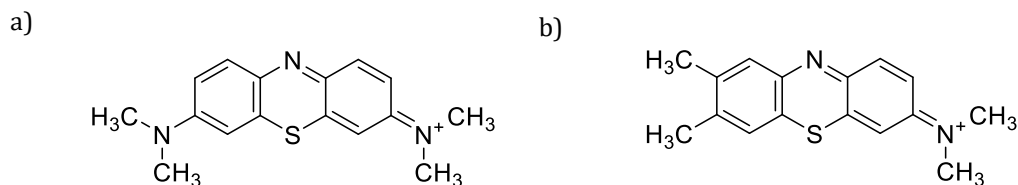


Figura 3. Estructura química de a) Azul de metileno, b) Azul de toluidina

Los estudios que examinan la eficacia de una combinación de TFD mediada por azul de metileno y azul de toluidina para tratar el sarcoma de Kaposi relacionado con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida también han resultado en una remisión completa de las lesiones, como así también han presentado excelentes resultados cosméticos en un solo estudio de pacientes.<sup>47</sup>

Un desafío importante para el avance de varios miembros de la clase de PSs de fenotiazina radica en su rápida excreción, la toxicidad en oscuridad y la inactivación metabólica.<sup>48</sup> Sin embargo, la generación de derivados mejorados de muchos miembros de esta clase de PSs está en curso.<sup>49</sup>

Las antraquinonas y cianinas son familias muy estudiadas dentro de los PSs no porfirínicos. La hipericina (ver Figura 4a), una antraquinona, es un compuesto natural que se encuentra en las especies *Hypericum*, un género de plantas con flores que históricamente se ha utilizado en medicina.<sup>50</sup> El descubrimiento y la caracterización de la hipericina se produjo en la década de 1980 durante las investigaciones sobre la causa del hipericismo, una fotosensibilidad de la piel observada en el ganado después de ingerir cantidades significativas de plantas *Hypericum*. La TFD mediada por hipericina depende en gran medida del oxígeno, sin observarse fotocitotoxicidad en entornos hipóxicos.<sup>46</sup> Se han realizado ensayos clínicos para tratar el carcinoma de células escamosas y el carcinoma de células basales, pero los resultados utilizando estos PSs, no son satisfactorios hasta la fecha. Se han llevado a cabo estudios destinados a la optimización y mejora de la dosificación, el suministro de fármacos y luz, y la preparación del área afectada.<sup>7</sup>

Los colorantes de cianina se han aplicado para teñir textiles, fotografía de haluro de plata, grabación óptica en modo térmico y, en TFD. En general, la longitud de onda de absorción de las cianinas aumenta en la región roja del espectro con el incremento de la longitud de la cadena de polimetina; sin embargo, esto puede causar cambios adicionales desfavorables en las propiedades de los fotosensibilizadores, como una menor estabilidad química y una disminución de la solubilidad.<sup>51</sup> La merocianina 540 (MC540) (ver Figura 4b)

es una cianina que se ha aplicado en casos de leucemias, así como linfoma y neuroblastoma en injertos de médula ósea. Aunque la MC540 se localiza en las células afectadas por leucemia, la fototoxicidad inducida después de la irradiación no es selectiva. Además, los estudios comparativos con otros PS como Foscan® han demostrado que éste es considerablemente más potente y selectivo en la destrucción de las células leucémicas después de la TFD.

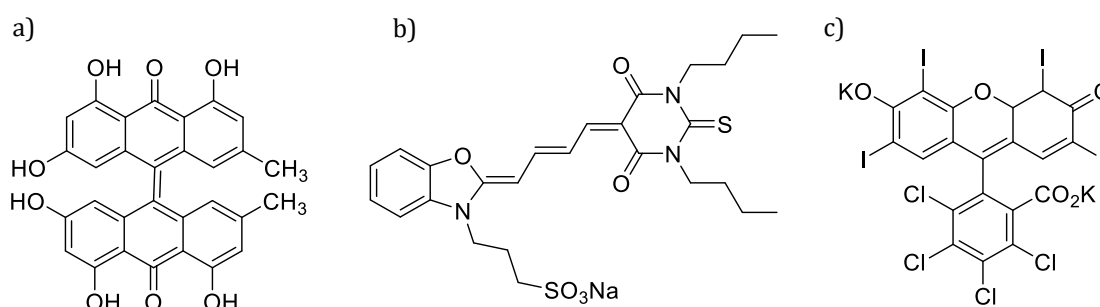


Figura 4. Estructura química de a) Hipericina, b) Merocianina 540 y c) Rosa de bengala

Otra familia de PS no porfirínicos son los xantenos, Rosa de bengala (RB) es un PS de esta familia (ver Figura 4c). En los xantenos, la presencia de átomos de halógeno aumenta la eficiencia del cruce entre sistemas al estado triplete y, en consecuencia, la producción de oxígeno singlete.<sup>7</sup>

## 1.2.2 Fotosensibilizadores porfirínicos

Los compuestos porfirínicos consisten en un macrociclo heterocíclico altamente conjugado que pueden contener un átomo metálico central. La presencia de un sistema de electrones  $\pi$  da lugar a la absorción a altas longitudes de onda. Como resultado, las porfirinas y derivados, han atraído la atención de los investigadores a nivel mundial por su aplicación como agentes fotosensibilizadores.<sup>52</sup> Como se describió anteriormente, pueden dividirse en PSs de primera, segunda y tercera generación.

### 1.2.2.1 Fotosensibilizadores de primera generación

La hematóporfirina (Hp) (Figura 5a) fue producida por primera vez en 1841 y fue la primera porfirina utilizada como PS. Los primeros estudios demostraron el potencial de Hp

como herramienta de diagnóstico para la detección de cáncer.<sup>19</sup> Sin embargo, uno de los principales inconvenientes fueron la alta dosis requerida para lograr una captación adecuada del fotosensibilizador en los tumores, lo que resultó en una fotosensibilidad inapropiada.<sup>46</sup> En 1955, Schwartz et al. demostraron que Hp consiste en una mezcla de porfirinas con diferentes propiedades.<sup>20</sup>

El primer PS que se empleó clínicamente para la terapia contra el cáncer fue una mezcla compleja de estructuras monoméricas, diméricas y oligoméricas de porfirinas, solubles en agua llamada derivado de hematoporfirina (HpD) (Figura 5b), obtenido por purificación y modificación química de Hp. Más tarde se conoció con el nombre comercial de Photofrin®.<sup>2,7,44</sup> HpD mostró una mejor selectividad tisular para los tumores y menos potencial fotosensibilizante en la piel en comparación con Hp.<sup>44</sup> Aunque Photofrin, también conocido como porfímero de sodio, sigue siendo el PS más utilizado,<sup>2,53</sup> presenta algunas limitaciones en sus aplicaciones clínicas incluida la fotosensibilidad de la piel durante varias semanas debido a la larga vida media del PS. Además, a 630 nm, la penetración efectiva de la luz en el tejido es pequeña (2–3 mm), y por el bajo coeficiente de extinción molar, se requieren altas concentraciones de Photofrin y luz para lograr una eficiente TFD.<sup>2,7,44,46</sup>

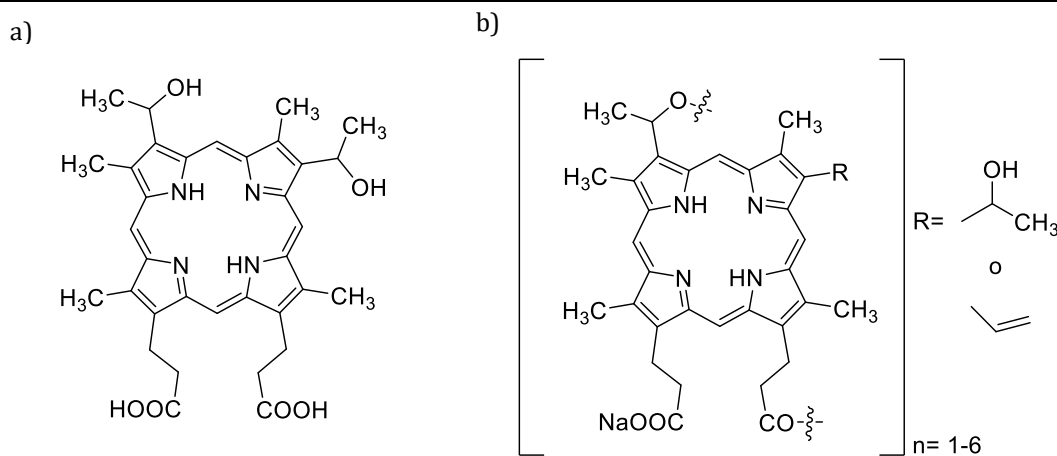


Figura 5. Estructura química de a) Hematoporfirina, b) Derivado de hematoporfirina

Las limitaciones de los fotosensibilizadores de primera generación forzaron la necesidad de investigar nuevos compuestos e iniciaron el desarrollo de fotosensibilizadores de segunda generación.<sup>54,55</sup>

1.2.2.2 Fotosensibilizadores de segunda generación

Los PSs de segunda generación, surgieron a finales de la década de 1980 como consecuencia de los inconvenientes asociados con los de primera generación.<sup>3,56</sup> Los PSs de segunda generación, en comparación con los compuestos de primera generación, son compuestos químicamente puros, absorben luz a longitudes de onda altas, lo que resulta en una mejor penetración de luz en los tejidos. Además, causan significativamente menos fotosensibilización de la piel después del tratamiento, tienen altos coeficientes de extinción molar y alto rendimiento cuántico de oxígeno singlete, mejorando el efecto fotodinámico y en consecuencia su actividad en TFD.<sup>36</sup> También, presentan menos efectos secundarios, lo que resulta de una mayor selectividad para los tejidos cancerosos y una eliminación más rápida del cuerpo.<sup>44</sup> Actualmente, en el grupo de los PSs de segunda generación se puede mencionar a 5-ALA, porfirinas, derivados de benzoporfirina, texafirinas, clorinas, análogos de bacterioclorina y ftalocianinas.<sup>36,44</sup>

El 5-ALA (o Levulan Kerastick, por su nombre comercial), Figura 6a, es el precursor de la protoporfirina IX, Figura 6 b. Es un profármaco que se convierte en un PS activo solo después de transformarse en protoporfirina IX. 5-ALA o sus ésteres (nombre comercial Metvix) se pueden emplear por vía tópica u oral en muchas aplicaciones clínicas.<sup>57,58</sup>

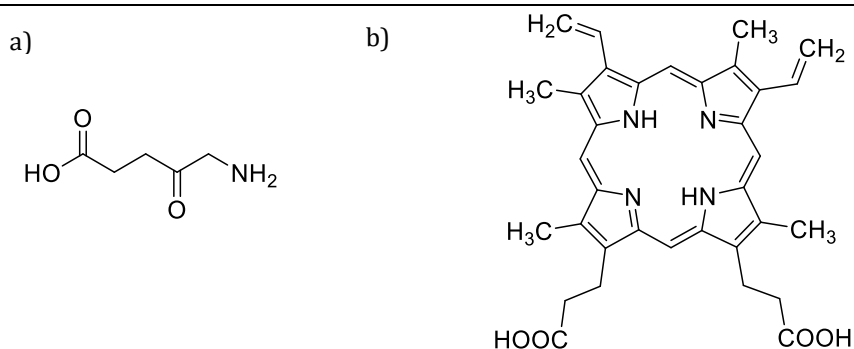


Figura 6. Estructura química de a) 5-ALA, b) Protoporfirina IX

De la familia de las porfirinas, meta-tetra (hidroxifenil) porfirina (*m*-THPP)<sup>59</sup>, (Figura 7a) demostró ser 25 a 30 veces más potente que HpD cuando se irradió a 648 nm.<sup>60</sup> 5,10,15,20-tetraquis (4-sulfanatofenil) -21H, 23H-porfirina (TPPS<sub>4</sub>)<sup>61</sup> (Figura 7b), exhibió una eficiencia fotoquímica más baja que las porfirinas meso-sustituidas que contienen menor número de grupo sulfonato.<sup>52</sup>

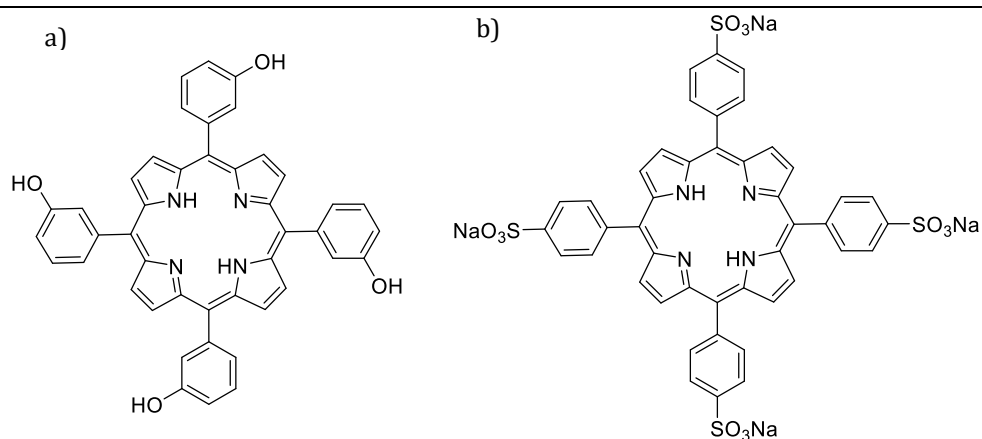


Figura 7. Estructura química de porfirinas a) *m*-THPP, b) TPPS4

Varios fotosensibilizadores comerciales son de la familia de las clorinas e incluyen el derivado mono ácido del anillo de benzoporfirina A (BPD-MA, Verteporfin, Visudyne®)<sup>62</sup> ver Figura 8a; meta-tetra(hidroxifenil)clorina (*m*-THPC, temoporfin, Foscan®)<sup>63</sup> ver Figura 8b; estañoetiletiopurpurina (SnET2, Rostaporfin, Purlytin®<sup>™</sup>)<sup>14</sup> ver Figura 9a; y N-aspartilclorina e6 (NPe6, Talaporfin, Ls)<sup>62,64</sup> ver Figura 9b. En comparación con las porfirinas, la estructura de las clorinas difiere en dos hidrógenos adicionales en un anillo de pirrol. Esta modificación estructural conduce a un desplazamiento batocrómico en la banda de absorción (640 a 700 nm) y un cambio en el  $\epsilon_{\max} \sim 40000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1,7}$

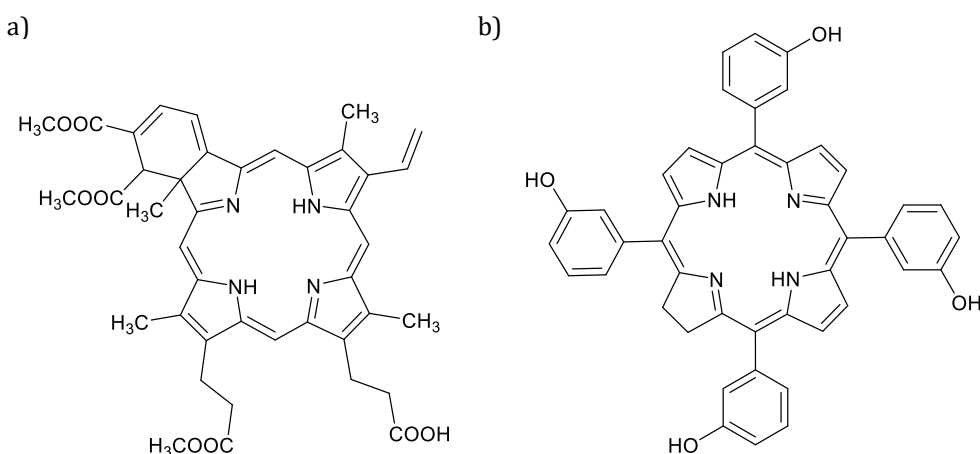


Figura 8. Estructura química de clorinas a) BPD-MA , b) *m*-THPC

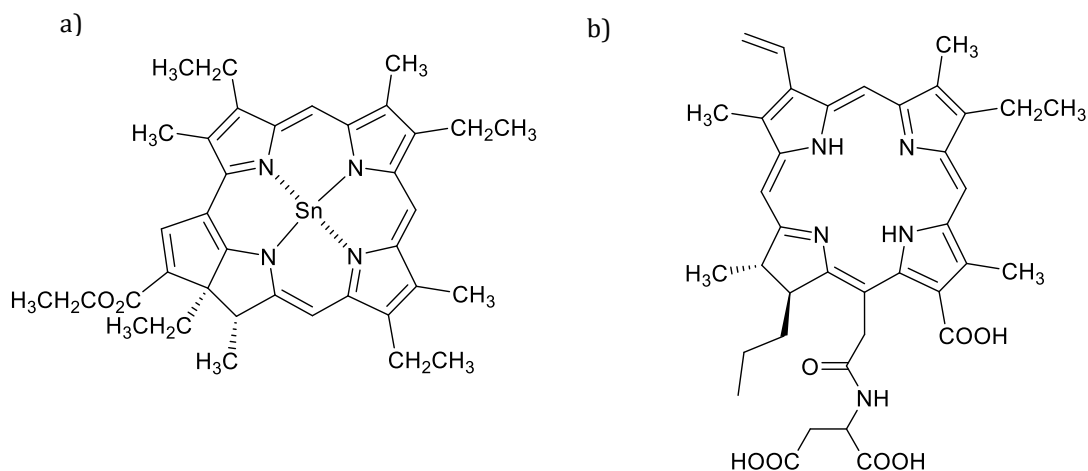


Figura 9. Estructura química de clorinas a) SnET2, b) NPe6

Las ftalocianinas (Pcs), son otra familia de fotosensibilizadores porfirínicos de segunda generación cuyo abordaje se desarrollará en profundidad en la sección 1.4.

Se dispone comercialmente de una mezcla de ftalocianinas de aluminio con diferentes grados de sulfonación, Photosens® (ver Figura 10); que presenta  $\lambda_{\text{máx}}$  a 676 nm. Photosens®, se ha utilizado en Rusia para tratar el cáncer de estómago, piel, labios y mama.<sup>65</sup> Sin embargo, se ha reportado que produce fototoxicidad de la piel durante varias semanas.<sup>7</sup>

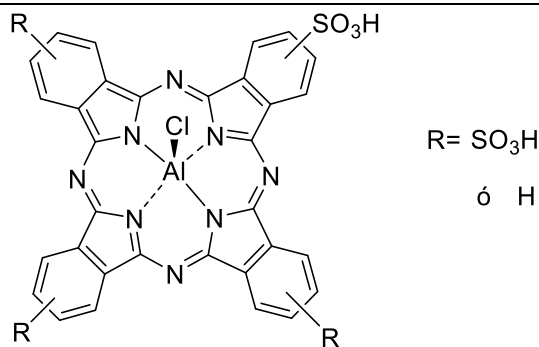


Figura 10. Estructura química de AlPc<sub>4</sub>, Photosens®

### 1.2.2.3 Fotosensibilizadores de tercera generación

La principal desventaja de los PSs de segunda generación es su escasa solubilidad en agua, que además de conducir a la formación de agregados y afectar negativamente el rendimiento cuántico de oxígeno singlete y la producción de ROS, es un factor significativamente limitante en su administración intravenosa y obliga a desarrollar nuevos métodos de administración de fármacos.<sup>44,66</sup> Con el fin de mejorar la limitada solubilidad en

agua, los PSs de segunda generación, se han encapsulado dentro de *carriers* o transportadores en sistemas de administración. Liposomas, micelas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas de oro, nanotubos de carbono, son algunos de los *carriers* más utilizados como sistemas de transporte de los PSs.<sup>35</sup> Además, se le pueden añadir moléculas que facilitan la llegada de los PSs al tejido tumoral. Las células tumorales presentan antígenos en la superficie celular por lo que los PSs de tercera generación pueden conjugarse con anticuerpos específicos. Estas alternativas, permiten una mejora de la selectividad y una mayor acumulación del fotosensibilizador en las áreas afectadas y, por lo tanto, brindan la posibilidad de reducir las dosis del fármaco mientras se mantienen efectos terapéuticos satisfactorios.<sup>44,46</sup>

Por lo tanto, los fotosensibilizadores de tercera generación, consisten en fotosensibilizadores de segunda generación que se han encapsulado en transportadores o se han modificado con agentes de direccionamiento, con el objetivo de mejorar la solubilidad de los PSs, y la selectividad del tratamiento al promover el direccionamiento tumoral.<sup>67</sup>

### 1.2.3 Transportadores más frecuentes para fotosensibilizadores de tercera generación

#### 1.2.3.1 *Liposomas*

Los liposomas son vesículas esféricas de tamaño nanométrico conformadas por una bicapa lipídica autoensamblada formada a partir de fosfolípidos y pueden contener colesterol. Desde el descubrimiento en 1961, se han convertido en una herramienta muy valiosa en biología, bioquímica y medicina. Los liposomas son el sistema transportador coloidal más ampliamente estudiado, que se puede cargar con sustancias como medicamentos y PS, con el objetivo de solubilizar, transportar y entregar a un objetivo específico, evitando así la degradación del fármaco y limitando los efectos adversos del no dirigido.<sup>68</sup> Después de que el PS se incorpora en el liposoma, hay dos mecanismos de absorción celular: los liposomas se fusionan con la membrana celular y liberan el contenido en el citosol, o las células fagocíticas pueden fagocitarlos y desintegrarlos dentro de los endosomas o lisosomas, liberando así el fármaco activo en la célula.<sup>69</sup> Los estudios realizados han sugerido que los PS administrados mediante liposomas pueden mejorar sustancialmente la eficacia y seguridad de TFD y la TFDA.<sup>35</sup>

### 1.2.3.2 *Micelas*

Las micelas son vesículas formadas por monocapas cerradas con un núcleo hidrófobo y una superficie polar, típicamente formadas por lípidos con un núcleo de ácido graso o por polímeros.<sup>70</sup> Las micelas poliméricas se forman en solución acuosa a partir de bloques anfifílicos o copolímeros de injerto y se han utilizado para transportar fármacos hidrofóbicos, que están atrapados físicamente y / o unidos covalentemente al núcleo hidrofóbico.<sup>71</sup>

### 1.2.3.3 *Nanopartículas poliméricas*

Las nanopartículas poliméricas poseen ventajas en comparación con otros vehículos de nanoentrega. El fármaco está atrapado, encapsulado o unido a una matriz de nanopartículas y, según el método de preparación se pueden obtener, nanopartículas, nanoesferas o nanocápsulas. Las nanocápsulas incluyen a los fármacos en una cavidad rodeada por una membrana de polímero, mientras que las nanoesferas son sistemas matriciales en las cuales el fármaco está disperso uniformemente en la nanopartícula. Las nanopartículas poliméricas biodegradables se han utilizado como vehículos de administración de fármacos para controlar la liberación de los mismos. En comparación con los liposomas, presentan mayor estabilidad y su tamaño y uniformidad ajustables impiden el reconocimiento por parte de los macrófagos, incrementando el tiempo de circulación en el torrente sanguíneo. Pueden penetrar en las células y permitir la liberación controlada de los PSs. Sus propiedades podrían ajustarse por la composición del polímero y por el recubrimiento.<sup>70</sup>

### 1.2.3.4 *Nanopartículas de oro*

La biocompatibilidad de las nanopartículas de oro (Au) ha fomentado su amplia utilización en muchos organismos diferentes. Las nanopartículas de Au generalmente se consideran biológicamente inertes, pero absorben luz que puede producir un importante efecto fototérmico. Las nanopartículas de oro se pueden usar como plataformas de suministro de fármacos, de forma similar a otras nanopartículas inorgánicas.



### 1.2.3.5 Nanotubos de carbono

En 1991, el científico japonés Sumio Iijima informó por primera vez el descubrimiento de los nanotubos de carbono (CNT) como un subproducto de la síntesis de fullereno.<sup>35</sup> Debido a las propiedades únicas de los CNT, especialmente su gran área superficial, permite que muchas otras moléculas como fármacos, péptidos y ácidos nucleicos pueden integrarse en sus paredes y extremos.<sup>72</sup> Los investigadores han demostrado que los CNT funcionalizados pueden atravesar la membrana celular de los mamíferos por endocitosis u otros mecanismos. Con la ayuda de péptidos o ligandos específicos en su superficie para reconocer receptores específicos de cáncer en la superficie celular, los CNT pueden transportar fármacos terapéuticos de manera más segura y efectiva a las células que antes no eran accesibles.<sup>73</sup>

## 1.3 Aplicaciones de fotosensibilizadores en terapia fotodinámica

La aplicación en clínica de la terapia fotodinámica implica la inyección intravenosa al paciente de un PS (Figura 11), el cual necesita un tiempo suficiente para distribuirse en el organismo y acumularse en determinadas células o tejidos tumorales. Al ser iluminadas con adecuada longitud de onda y al combinarse con oxígeno molecular, forma ROS y oxígeno singlete; y éstos al reaccionar con los diferentes componentes celulares, poseen un efecto citotóxico generando daño y muerte celular seguido de regresión tumoral.<sup>36,45,74,75</sup>

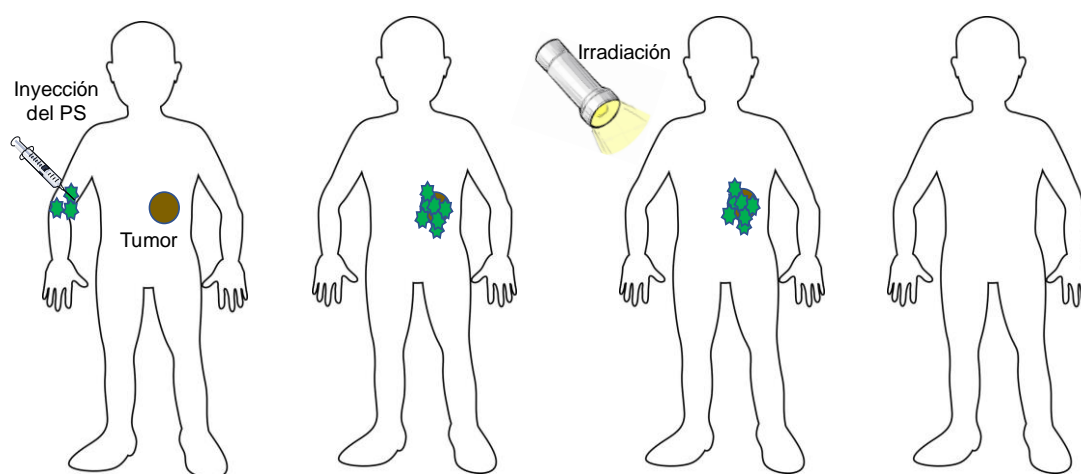


Figura 11. Aplicación clínica de la terapia fotodinámica para el cáncer.

La TFD se puede aplicar en asociación con otras técnicas terapéuticas como la cirugía o la quimioterapia. En el caso quirúrgico para resección tumoral, la TFD se aplica para ayudar a destruir las células cancerosas restantes después de la cirugía.<sup>76,77,78</sup> En el caso de la quimioterapia, varios ensayos han demostrado efectos sinérgicos de la combinación de TFD con dosis bajas de fármacos quimioterapéuticos. La combinación destruye las células cancerosas de manera más eficiente y también reduce los efectos secundarios de la quimioterapia, debido a las dosis más bajas de medicamentos quimioterapéuticos necesarios para obtener el efecto deseado.<sup>78,79,80</sup>

La TFD se aplica ampliamente en dermatología, por la fácil administración del PS y luz, sin ser invasivo. Sin embargo, las fuentes de luz, como los láseres, pueden combinarse con sistemas de fibra óptica que permiten el abordaje a lugares inaccesibles, como la vejiga urinaria, el tracto digestivo, el cerebro o los tumores profundos.<sup>78</sup>

En dermatología, la TFD tópica es efectiva para afecciones cutáneas dermatológicas<sup>81</sup> o precancerosas como el carcinoma de células escamosas,<sup>82</sup> el carcinoma basocelular superficial,<sup>83,84</sup> la queratosis actínica,<sup>85</sup> la enfermedad de Bowen,<sup>81,86</sup> micosis fungoide (un subtipo indolente de linfoma cutáneo de células T),<sup>84,87,88</sup> sarcoma de Kaposi, enfermedad de Paget y linfoma cutáneo de células B.<sup>89</sup> También se usa para otros trastornos proliferativos, como malformaciones vasculares<sup>90</sup> o cicatrices queloides.<sup>91,92</sup> En dermatología estética, la TFD se usa ampliamente para el tratamiento de dermatosis inflamatorias que tienen un alto impacto psicológico, como la esclerodermia localizada,<sup>93</sup> el acné vulgaris,<sup>94</sup> la rosácea<sup>95</sup> y el granuloma anular;<sup>96</sup> así como para indicaciones estéticas como piel foto-envejecida o hiperplasia de glándulas sebáceas.<sup>81</sup> La TFD es útil para el tratamiento de diversas enfermedades virales como verrugas (virus del papiloma humano),<sup>70,97</sup> o lesiones virales de la piel (molusco contagioso y herpes simple),<sup>81</sup> diversas enfermedades micóticas,<sup>98</sup> enfermedades parasitarias como la leishmaniasis<sup>99</sup> o la tricomoniasis bovina.<sup>100</sup> Más allá de todos los PS que se ensayan para tratar enfermedades dermatológicas, el 5-ALA de aplicación tópica, es el principal PS utilizado en la clínica para tratamientos dermatológicos.<sup>57</sup> La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel y las terapias para tratarla incluyen agentes tópicos como corticoides, sistémicos orales como metotrexato o ciclosporina y anticuerpos monoclonales como adalimumab. La TFD aplicando psoraleno más luz ultravioleta a menudo es una terapia eficaz para el tratamiento de la psoriasis.<sup>101</sup>

Actualmente, la TFD se utiliza con éxito en oftalmología para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD).<sup>102</sup> La AMD es una de las causas

principales de ceguera en personas mayores de 50 años, y se debe a un crecimiento anormal de vasos sanguíneos en la retina, la ruptura de estos vasos genera pérdida de la capacidad visual. Para tratar esta patología se aprobó recientemente en varios países el uso de verteporfin, Visudyne®.<sup>54</sup>

La TFD ha demostrado ser efectiva también en el tratamiento de aterosclerosis, una enfermedad coronaria, en donde se logró reducir el tamaño de las placas de ateroma en un 80-100% en modelos animales. Actualmente hay estudios clínicos de fase 1 utilizando Lutetium PSs de la familia de los texafrines.<sup>54,103</sup>

La aparición de patógenos bacterianos resistentes a los antibióticos ha proporcionado el impulso necesario para nuevos descubrimientos de fármacos o tecnologías que permitan combatir cepas resistentes.<sup>104</sup> La TFD aplicada en microorganismos dio origen a la Terapia Fotodinámica Antimicrobiana (TFDA). Aunque las investigaciones dirigidas hacia la terapia en microorganismos se incrementaron en los últimos años, constituye un campo aún poco explorado. En la TFDA, los microorganismos se impregnan previamente con un PS y posteriormente se exponen a una fuente de luz. Los ROS generados, imparten un efecto citotóxico en los microorganismos, como ocurre en las células eucariotas.

Las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas reaccionan de manera diferente a la terapia fotodinámica antimicrobiana.<sup>101</sup> La presencia de fosfolípidos, lipoproteínas complejas y polisacáridos en la envoltura externa adicional de las especies Gram-negativas las hace impermeables a los compuestos neutros y aniónicos. Por tal motivo se han desarrollado varias estrategias alternativas para superar esta barrera. Los PSs neutros o aniónicos aumentan su efectividad si se usan en combinación con componentes que generen alteración de la membrana, aumentando su permeabilidad como el EDTA<sup>105</sup> o polimixina.<sup>106</sup> Se ha demostrado que los PSs cargados positivamente tienen mayor efectividad contra bacterias Gram-negativas.<sup>107,108</sup>

#### **1.4 Ftalocianinas**

Las Pcs se observaron por primera vez en 1907 como un subproducto altamente coloreado e insoluble durante la preparación de 2-cianobenzamida.<sup>109</sup> Las Pcs son PSs sintéticos de segunda generación, análogos de las porfirinas. Consisten en heterociclos aromáticos formados por cuatro anillos de isoindol unidos por átomos de nitrógeno. Debido

a la deslocalización de sus 18 electrones  $\pi$ , las Pcs tienen propiedades físicas y ópticas únicas.<sup>110</sup> Sus cualidades han causado numerosos intereses en muchos campos, como pigmentos o colorantes<sup>110</sup>, dispositivos electrónicos orgánicos,<sup>111</sup> dispositivos electrocrómicos,<sup>112</sup> células fotovoltaicas solares,<sup>113</sup> materiales ópticos no lineales,<sup>114</sup> fotocatalizadores<sup>115</sup> y en TFD.<sup>110</sup>

La lipofilidad del núcleo aromático y la planaridad de las Pcs, conducen a una baja solubilidad en medios acuosos y una tendencia a agregarse, respectivamente. La agregación, puede reducirse modificando la estructura, controlando la concentración, eligiendo un solvente adecuado o agregando adyuvantes. Es importante tener presente que la agregación de las Pcs generalmente es desfavorable en las aplicaciones de TFD. Las propiedades físicas y químicas de las Pcs, se pueden ajustar mediante la adición de sustituyentes apropiados y grupos funcionales en posiciones periféricas y/o axiales.<sup>70,116</sup>

Las Pcs pueden estar libres o coordinadas con metales como se muestra en la figura 12 a y b respectivamente. A su vez, los metales pueden estar coordinados con diversos sustituyentes lo que se denomina sustitución en posición axial y se muestra en la Figura 12 c como "A".

La selección del ión central y las modificaciones sintéticas ofrecen numerosas opciones para controlar sus propiedades físicas. La coordinación con metales de transición diamagnéticos, como  $Zn^{2+}$ ,  $Si^{4+}$  y  $Al^{3+}$  da como resultado tiempos de vida del triplete excitado más largos y altos rendimientos cuánticos de oxígeno singlete.<sup>117,118</sup> Por el contrario, la complejación con iones paramagnéticos, como  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  y  $Cu^{2+}$ , dan complejos con vidas cortas de triplete y capacidades de generación de ROS débiles.<sup>119,120</sup>

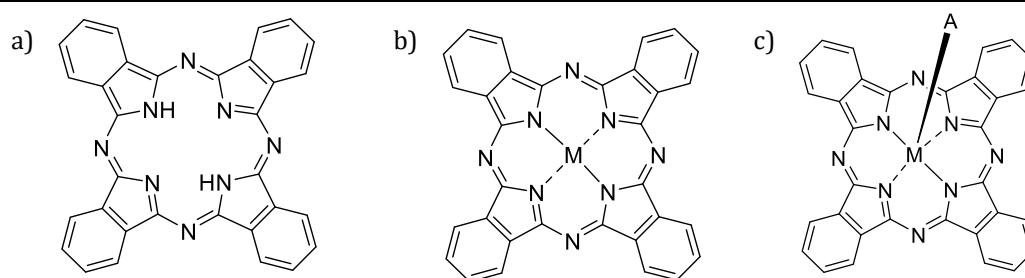


Figura 12. Estructuras de ftalocianinas a) Libre, sin metal; b) Coordinada con un metal; c) Coordinada con un metal y con un sustituyente axial (A).

La sustitución axial del ión central generalmente disminuye la tendencia a agregarse debido al impedimento estérico y también la naturaleza de la sustitución modula la

solubilidad y otras propiedades. Los iones más adecuados para esta sustitución son  $Al^{3+}$  con uno, o  $Si^{+4}$  con dos sitios de coordinación.<sup>70</sup>

Las sustituciones periféricas, afectan la agregación, las  $\lambda_{m\acute{a}x}$  de absorción, el rendimiento cuántico de oxígeno singlete, la biodistribución y la solubilidad de las Pcs.<sup>25</sup> En la Figura 13 se muestran los sustituyentes periféricos. Los mismos, pueden estar en posición  $\alpha$  o  $\beta$  si el anillo isoindol es mono sustituido, o  $\alpha_2$  y  $\beta_2$  si el anillo es di sustituido.

### Sustituciones periféricas

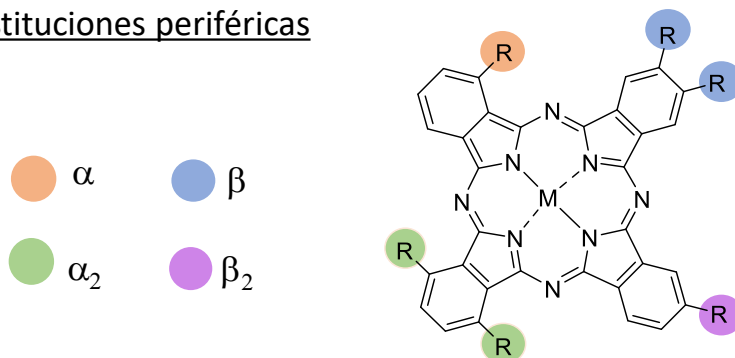


Figura 13. Sustituciones periféricas  $\alpha$  y  $\beta$  de las Pcs

El número y tipo de sustituyentes de las subunidades isoindol, genera Pcs con diferentes simetrías. Las Pcs que contienen cuatro subunidades iguales se denominan  $A_4$ , mientras que las Pcs compuestas por dos subunidades diferentes pueden ser del tipo  $A_2B_2$  o  $A_3B$  (Figura 14).<sup>116</sup>

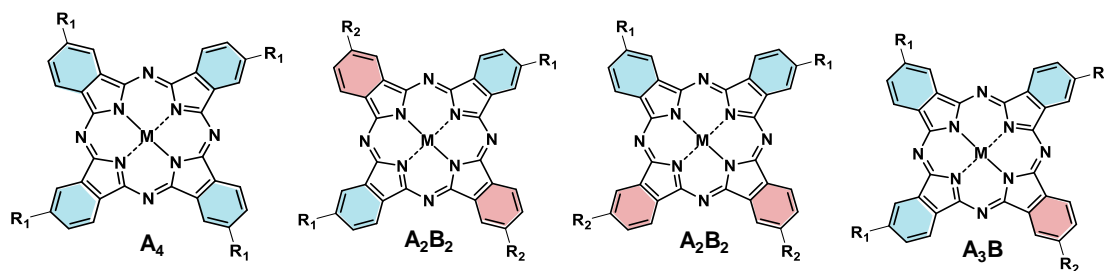


Figura 14. Sustituciones periféricas de las Pcs compuestas por subunidades iguales ( $A_4$ ) y dos subunidades diferentes  $A_2B_2$  o  $A_3B$ .

Las Pcs tienen muchas ventajas en las aplicaciones de TFD como resultado de sus altos coeficientes de extinción molar ( $\epsilon_{m\acute{a}x} > 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y su longitud de onda máxima de absorción,  $\lambda_{m\acute{a}x} > 670 \text{ nm}$ , que coinciden con el rango óptimo de absorción de luz de los tejidos de 650 a 850nm (ventana fototerapéutica).<sup>120</sup> Además de su fuerte absorción en la

ventana fototerapéutica, las Pcs muestran una absorción baja o nula a 400–600 nm, donde la intensidad de la luz solar es máxima. En consecuencia, se disminuyen los niveles de fotosensibilización de la piel causados por la luz del día. Además, sus estructuras químicas se podrían modificar fácilmente, lo que permite que las Pcs tengan propiedades físicas y químicas, farmacocinética y biodistribución fácilmente ajustables.<sup>121,122</sup> Esta es la razón principal por la cual las investigaciones de Pcs novedosas continúan atrayendo interés. El uso de Pcs como PSs para TFD sigue siendo limitado. Sólo una Pc cloro aluminio sulfonada, Photosens®, ha sido aprobada para aplicaciones clínicas en Rusia (ver Figura 10) para tratar cáncer de piel, mama, pulmón, orofaringe, laringe, cabeza y cuello, sarcoma M1, tumores epibulbar y coroidales, tumores de ojos y párpados y cáncer cervical.<sup>25,123,124</sup> En la Figura 15 se muestran las Pcs aplicadas en ensayos clínicos.<sup>65</sup> El fotosensibilizador ZnPc (CGP55847) formulado en liposomas compuestos de 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC) y 1,2-dioleoilfosfatidilserina (OOPS), fue desarrollado por QLT Phototherapeutics (Vancouver, Canadá) y patrocinado por Ciba Geigy (Novartis, Basilea, Suiza). Es la primer Pc que llega a ensayos clínicos (Fase I / II, Suiza) para TFD de cáncer temprano en el tracto aerodigestivo superior. Sin embargo, los ensayos clínicos fueron descontinuados y la razón no está clara.<sup>25</sup> PC4 para administración tópica e intravenosa, se encuentra en ensayos clínicos en EE.UU; fase I (administración tópica): queratosis actínica, enfermedad de Bowen, cáncer de piel o micosis fungoide en estadio I o estadio II (septiembre de 2004-agosto de 2010), fase I (administración intravenosa): cáncer de piel o tumores sólidos, metastásico en la piel (agosto 2001 – febrero de 2006).<sup>125,126</sup> Para Photocyanine, los ensayos clínicos de fase I comenzaron en 2008 con la aprobación de la Administración Estatal de Alimentos y Medicamentos de China. Actualmente, se está aplicando para ensayos clínicos de fase II para cáncer de piel y esófago.<sup>65,127</sup>

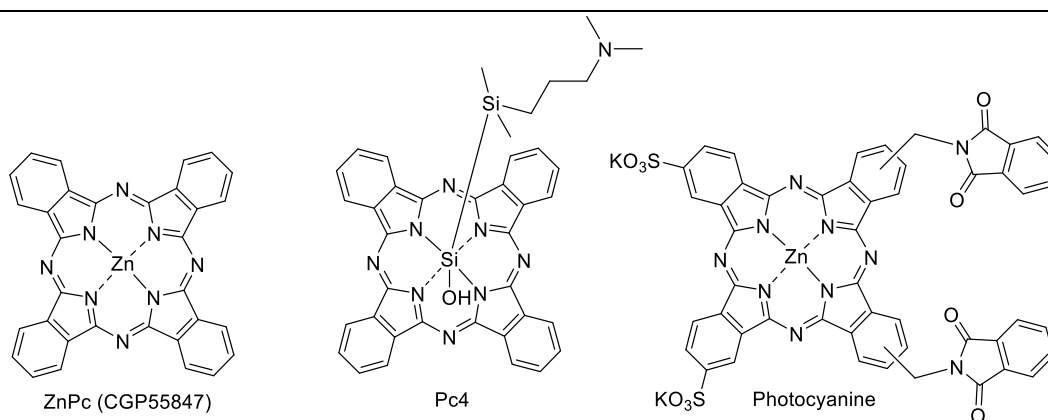


Figura 15. Ftalocianinas aplicadas en ensayos clínicos.

## 1.5 Objetivo general

Evaluando los antecedentes detallados anteriormente en terapia fotodinámica y el rol de las ftalocianinas como fotosensibilizadores, se planteó como objetivo general de esta tesis:

“Sintetizar y caracterizar Zn-ftalocianinas con distintos sustituyentes. Analizar los compuestos obtenidos, su incorporación en vesículas liposomales, y las aplicaciones en terapia fotodinámica *in vitro*.”

### 1.5.1 Objetivos específicos

Para alcanzar al objetivo general, se plantearon como objetivos específicos:

- Sintetizar diversos ftalonitrilos y subftalocianinas como precursores de ftalocianinas.
- Sintetizar ftalocianinas
- Realizar la caracterización de ftalocianinas por espectroscopía de absorción y fluorescencia.
- Realizar pruebas *in vitro* en terapia fotodinámica y terapia fotodinámica antimicrobiana.
- Sintetizar liposomas para vehicular las ftalocianinas, caracterizarlos y evaluar su actividad en terapia fotodinámica y terapia fotodinámica antimicrobiana *in vitro*.

## 1.6 Bibliografía

1. Hamblin, M. R.; Huang, Y., *Handbook of photomedicine*. Taylor & Francis: 2013.
2. Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; Hamblin, M. R.; Juzeniene, A.; Kessel, D., Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians* **2011**, *61* (4), 250-281.
3. Josefsen, L. B.; Boyle, R. W., Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Metal-based drugs* **2008**, *2008*, 276109.
4. Daniell, M. D.; Hill, J. S., A history of photodynamic therapy. *The Australian and New Zealand journal of surgery* **1991**, *61* (5), 340-348.
5. Ackroyd, R.; Kelty, C.; Brown, N.; Reed, M., The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochemistry and photobiology* **2001**, *74* (5), 656-669.
6. Gambichler, T.; Breuckmann, F.; Boms, S.; Altmeyer, P.; Kreuter, A., Narrowband UVB phototherapy in skin conditions beyond psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2005**, *52* (4), 660-670.
7. Ormond, A. B.; Freeman, H. S., Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials* **2013**, *6* (3), 817-840.
8. Dolmans, D. E. J. G. J.; Fukumura, D.; Jain, R. K., Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer* **2003**, *3* (5), 380-387.
9. Prime, J., Les accidentes toxiques par l'éosinate de sodium. *Jouve and Boyer* **1900**.
10. Raab, O., Über die Wirkung fluorescirender Stoffe auf Infusorien. *Z. biol.* **1900**, *39*, 524-546.
11. Finsen, N., *Phototherapy*. Edward Arnold: 1901.
12. Von Tappeiner, H., Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Munch Med Wochenschr* **1903**, *1*, 2042-2044.
13. von Tappeiner, H.; Jodlbauer, A., *Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen: Gesammelte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung: aus dem pharmakologischen Institute der K. Universität München*. Verlag von FCW Vogel: 1907.
14. Sternberg, E. D.; Dolphin, D.; Brückner, C., Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron* **1998**, *54* (17), 4151-4202.
15. Sellera, F. P.; Nascimento, C. L.; Ribeiro, M. S., *Photodynamic therapy in veterinary medicine: From basics to clinical practice*. Springer: 2016.
16. Hausman, W., Die sensibilisierende Wirkung des Hamatoporphyrins. *Biochem Z* **30**:276-316. **1911**.
17. Meyer-Betz, F., Untersuchung über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hamatoporphyrins und anderer Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffs. *Dtsch Arch Klin Med* **1913**, *112*, 476-503.
18. Auler, H.; Banzer, G., Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **1942**, *53* (2), 65-68.
19. Policard, A., Etude sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de wood. *Biologie Comptes Rendus* **1924**, *91*, 1423.
20. Schwartz, S.; Absolon, K.; Vermund, H., Some relationships of porphyrins, X-rays and tumors. *Univ. Minn. Med. Bull* **1955**, *27*, 7-8.



21. Lipson, R. L.; Baldes, E. J.; Olsen, A. M., The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *Journal of the National Cancer Institute* **1961**, *26*, 1-11.
22. Diamond, I.; Mcdonagh, A.; Wilson, C.; Granelli, S.; Nielsen, S.; Jaenicke, R., Photodynamic therapy of malignant tumours. *The Lancet* **1972**, *300* (7788), 1175-1177.
23. Dougherty, T. J.; Kaufman, J. E.; Goldfarb, A.; Weishaupt, K. R.; Boyle, D.; Mittleman, A., Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer research* **1978**, *38* (8), 2628-2635.
24. Malik, Z.; Lugaci, H., Destruction of erythroleukaemic cells by photoactivation of endogenous porphyrins. *British journal of cancer* **1987**, *56* (5), 589.
25. Sekkat, N.; van den Bergh, H.; Nyokong, T.; Lange, N., Like a bolt from the blue: phthalocyanines in biomedical optics. *Molecules* **2011**, *17* (1), 98-144.
26. Trindade, F. Z.; Pavarina, A. C.; Ribeiro, A. P. D.; Bagnato, V. S.; Vergani, C. E.; de Souza Costa, C. A., Toxicity of photodynamic therapy with LED associated to Photogem®: An in vivo study. *Lasers in medical science* **2012**, *27* (2), 403-411.
27. Beneš, J.; Poučková, P.; Zeman, J.; Zadinova, M.; ŠUNKA, P.; Lukeš, P.; Kolářová, H., Effects of tandem shock waves combined with photosan and cytostatics on the growth of tumours. *Folia Biologica (Praha)* **2011**, *57* (6), 255-260.
28. Macmillan, J. D.; Maxwell, W. A.; Chichester, C. O., Lethal photosensitization of microorganisms with light from a continuous-wave gas laser. *Photochemistry and photobiology* **1966**, *5* (7), 555-565.
29. Takahashi, P. K.; Toups, H. J.; Greenberg, D. B.; Dimopoulos, G. T.; Rusoff, L. L., Irradiation of *Escherichia coli* in the visible spectrum with a tunable organic-dye laser energy source. *Appl. Environ. Microbiol.* **1975**, *29* (1), 63-67.
30. [http://www.anmat.gov.ar/EspecMed/abril/especmed\\_monofarmacos\\_08.asp](http://www.anmat.gov.ar/EspecMed/abril/especmed_monofarmacos_08.asp) (accessed Noviembre 2019).
31. [http://www.anmat.gov.ar/webanmat/EspecMed/noviembre/especmed\\_monofarmacos\\_07.asp](http://www.anmat.gov.ar/webanmat/EspecMed/noviembre/especmed_monofarmacos_07.asp) (accessed Noviembre 2019).
32. [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) (accessed Noviembre 2019).
33. [http://www.anmat.gov.ar/EspecMed/diciembre/certificados\\_monofarmacos\\_07.asp](http://www.anmat.gov.ar/EspecMed/diciembre/certificados_monofarmacos_07.asp) (accessed Noviembre 2019).
34. [http://www.anmat.gov.ar/EspecMed/febrero/certificados\\_monofarmacos07.asp](http://www.anmat.gov.ar/EspecMed/febrero/certificados_monofarmacos07.asp) (accessed Noviembre 2019).
35. Yin, R.; Agrawal, T.; Khan, U.; Gupta, G. K.; Rai, V.; Huang, Y. Y.; Hamblin, M. R., Antimicrobial photodynamic inactivation in nanomedicine: small light strides against bad bugs. *Nanomedicine (London, England)* **2015**, *10* (15), 2379-2404.
36. Yoon, I.; Li, J. Z.; Shim, Y. K., Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clinical endoscopy* **2013**, *46* (1), 7-23.
37. Ogilby, P. R., Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. *Chemical Society reviews* **2010**, *39* (8), 3181-3209.
38. Nonell, S.; Flors, C., *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences*. Royal Society of Chemistry: 2016; Vol. 1.
39. Wilson, B. C.; Patterson, M. S., The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Physics in Medicine and Biology* **2008**, *53* (9), R61-R109.

40. Zuluaga, M. F.; Lange, N., Combination of photodynamic therapy with anti-cancer agents. *Current medicinal chemistry* **2008**, *15* (17), 1655-1673.
41. Wilson, B. C.; Jeeves, W. P.; Lowe, D. M., In vivo and post mortem measurements of the attenuation spectra of light in mammalian tissues. *Photochemistry and photobiology* **1985**, *42* (2), 153-162.
42. Doiron, D. R.; Svaasand, L. O.; Profio, A. E., Light dosimetry in tissue: application to photoradiation therapy. *Advances in experimental medicine and biology* **1983**, *160*, 63-76.
43. Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R., Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **2004**, *1* (4), 279-293.
44. Kwiatkowski, S.; Knap, B.; Przystupski, D.; Saczko, J.; Kedzierska, E.; Knap-Czop, K.; Kotlinska, J.; Michel, O.; Kotowski, K.; Kulbacka, J., Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **2018**, *106*, 1098-1107.
45. Robertson, C. A.; Evans, D. H.; 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), 1-8.
46. O'Connor, A. E.; Gallagher, W. M.; Byrne, A. T., Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochemistry and photobiology* **2009**, *85* (5), 1053-1074.
47. Tardivo, J. P.; Giglio, A. D.; Paschoal, L. H.; Baptista, M. S., New photodynamic therapy protocol to treat AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Photomedicine and Laser Therapy* **2006**, *24* (4), 528-531.
48. Wainwright, M.; Grice, N. J.; Pye, L. E., Phenothiazine photosensitizers: part 2. 3, 7-Bis (aryl amino) phenothiazines. *Dyes and pigments* **1999**, *42* (1), 45-51.
49. Jiang, C.; Yang, W.; Wang, C.; Qin, W.; Ming, J.; Zhang, M.; Qian, H.; Jiao, T., Methylene Blue-Mediated Photodynamic Therapy Induces Macrophage Apoptosis via ROS and Reduces Bone Resorption in Periodontitis. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2019**, *2019*.
50. Kubin, A.; Wierrani, F.; Burner, U.; Alth, G.; Grunberger, W., Hypericin-the facts about a controversial agent. *Current pharmaceutical design* **2005**, *11* (2), 233-253.
51. Wainwright, M., Non-porphyrin photosensitizers in biomedicine. *Chemical Society reviews* **1996**, *25* (5), 351-359.
52. Pushpan, S. K.; Venkatraman, S.; Anand, V. G.; Sankar, J.; Parmeswaran, D.; Ganesan, S.; Chandrashekar, T. K., Porphyrins in photodynamic therapy - a search for ideal photosensitizers. *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents* **2002**, *2* (2), 187-207.
53. Shi, J.; Kantoff, P. W.; Wooster, R.; Farokhzad, O. C., Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nature reviews. Cancer* **2017**, *17* (1), 20-37.
54. Zhang, J.; Jiang, C.; Figueiró Longo, J. P.; Azevedo, R. B.; Zhang, H.; Muehlmann, L. A., An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2018**, *8* (2), 137-146.
55. Chatterjee, D. K.; Fong, L. S.; Zhang, Y., Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. *Adv Drug Deliv Rev* **2008**, *60* (15), 1627-1637.
56. Nayak, C. S., Photodynamic therapy in dermatology. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology* **2005**, *71* (3), 155.
57. Morton, C. A., The emerging role of 5-ALA-PDT in dermatology: is PDT superior to standard treatments? *The Journal of dermatological treatment* **2002**, *13* Suppl 1, S25-29.

58. De Rosa, F. S.; Bentley, M. V. L., Photodynamic therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives. *Pharmaceutical research* **2000**, *17* (12), 1447-1455.
59. Wainwright, M., Photodynamic therapy-from dyestuffs to high-tech clinical practice. *Rev. Prog. Color. Relat. Top* **2004**, *34*, 95-109.
60. Bonnett, R., Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chemical Society reviews* **1995**, *24* (1), 19.
61. Ledo, E.; Ledo, A., Phototherapy, photochemotherapy, and photodynamic therapy: unapproved uses or indications. *Clin Dermatol* **2000**, *18* (1), 77-86.
62. Moan, J.; Peng, Q., An outline of the history of PDT. *Photodynamic therapy* **2003**, *2*, 1-18.
63. Moor, A. C.; Ortel, B.; Hasan, T., Mechanisms of photodynamic therapy. *Photodynamic Therapy* **2003**, 19-57.
64. Bellnier, D. A.; Greco, W. R.; Loewen, G. M.; Nava, H.; Oseroff, A. R.; Pandey, R. K.; Tsuchida, T.; Dougherty, T. J., Population pharmacokinetics of the photodynamic therapy agent 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a in cancer patients. *Cancer research* **2003**, *63* (8), 1806-1813.
65. 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.
66. Nowak-Stepniowska, A.; Pergoń, P.; Padzik-Graczyk, A., Photodynamic method of cancer diagnosis and therapy--mechanisms and applications. *Postepy biochemii* **2013**, *59* (1), 53-63.
67. Lim, C. K.; Heo, J.; Shin, S.; Jeong, K.; Seo, Y. H.; Jang, W. D.; Park, C. R.; Park, S. Y.; Kim, S.; Kwon, I. C., Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of Cancer. *Cancer letters* **2013**, *334* (2), 176-187.
68. Sadasivam, M.; Avci, P.; Gupta, G. K.; Lakshmanan, S.; Chandran, R.; Huang, Y. Y.; Kumar, R.; Hamblin, M. R., Self-assembled liposomal nanoparticles in photodynamic therapy. *European journal of nanomedicine* **2013**, *5* (3).
69. Samad, A.; Sultana, Y.; Aqil, M., Liposomal drug delivery systems: an update review. *Current drug delivery* **2007**, *4* (4), 297-305.
70. Rak, J.; Pouckova, P.; Benes, J.; Vetricka, D., Drug Delivery Systems for Phthalocyanines for Photodynamic Therapy. *Anticancer research* **2019**, *39* (7), 3323-3339.
71. van Nostrum, C. F., Polymeric micelles to deliver photosensitizers for photodynamic therapy. *Adv Drug Deliv Rev* **2004**, *56* (1), 9-16.
72. Xiao, H.; Zhu, B.; Wang, D.; Pang, Y.; He, L.; Ma, X.; Wang, R.; Jin, C.; Chen, Y.; Zhu, X., Photodynamic effects of chlorin e6 attached to single wall carbon nanotubes through noncovalent interactions. *Carbon* **2012**, *50* (4), 1681-1689.
73. Ji, S.-r.; Liu, C.; Zhang, B.; Yang, F.; Xu, J.; Long, J.; Jin, C.; Fu, D.-l.; Ni, Q.-x.; Yu, X.-j., Carbon nanotubes in cancer diagnosis and therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* **2010**, *1806* (1), 29-35.
74. Acedo, P.; Stockert, J. C.; Canete, M.; Villanueva, A., Two combined photosensitizers: a goal for more effective photodynamic therapy of cancer. *Cell death & disease* **2014**, *5*, e1122.
75. Allison, R. R.; Moghissi, K., Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clinical endoscopy* **2013**, *46* (1), 24-29.
76. Tedesco, A. C.; Rotta, J.; Lunardi, C. N., Synthesis, photophysical and photochemical aspects of phthalocyanines for photodynamic therapy. *Current Organic Chemistry* **2003**, *7* (2), 187-196.

77. ALLEN, C. M.; SHARMAN, W. M.; LIER, J. E. V., Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2001**, 05 (02), 161-169.
78. Moreira, L. M.; dos Santos, F. V.; Lyon, J. P.; Maftoum-Costa, M.; Pacheco-Soares, C.; da Silva, N. S., Photodynamic therapy: porphyrins and phthalocyanines as photosensitizers. *Australian journal of chemistry* **2008**, 61 (10), 741-754.
79. Crescenzi, E.; Chiaviello, A.; Canti, G.; Reddi, E.; Veneziani, B. M.; Palumbo, G., Low doses of cisplatin or gemcitabine plus Photofrin/photodynamic therapy: Disjointed cell cycle phase-related activity accounts for synergistic outcome in metastatic non-small cell lung cancer cells (H1299). *Molecular cancer therapeutics* **2006**, 5 (3), 776-785.
80. Crescenzi, E.; Varriale, L.; Iovino, M.; Chiaviello, A.; Veneziani, B. M.; Palumbo, G., Photodynamic therapy with indocyanine green complements and enhances low-dose cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* **2004**, 3 (5), 537-544.
81. Babilas, P.; Schreml, S.; Landthaler, M.; Szeimies, R. M., Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* **2010**, 26 (3), 118-132.
82. Ratour-Bigot, C.; Chemidling, M.; Montlahuc, C.; Abirached, G.; Madjlessi, N.; Bullier, C.; Battistella, M.; Bagot, M.; Lebbe, C.; Basset-Seguín, N., Squamous Cell Carcinoma Following Photodynamic Therapy for Cutaneous Bowen's Disease in a Series of 105 Patients. *Acta dermato-venereologica* **2016**, 96 (5), 658-663.
83. Cosgarea, R.; Susan, M.; Crisan, M.; Senila, S., Photodynamic therapy using topical 5-aminolaevulinic acid vs. surgery for basal cell carcinoma. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* **2013**, 27 (8), 980-984.
84. Christensen, E.; Mork, C.; Skogvoll, E., High and sustained efficacy after two sessions of topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for basal cell carcinoma: a prospective, clinical and histological 10-year follow-up study. *The British journal of dermatology* **2012**, 166 (6), 1342-1348.
85. Gupta, A. K.; Paquet, M., Network meta-analysis of the outcome 'participant complete clearance' in nonimmunosuppressed participants of eight interventions for actinic keratosis: a follow-up on a Cochrane review. *The British journal of dermatology* **2013**, 169 (2), 250-259.
86. Zaar, O.; Fougelberg, J.; Hermansson, A.; Gillstedt, M.; Wennberg-Larko, A. M.; Paoli, J., Effectiveness of photodynamic therapy in Bowen's disease: a retrospective observational study in 423 lesions. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* **2017**, 31 (8), 1289-1294.
87. Debu, A.; Girard, C.; Kluger, N.; Guillot, B.; Dereure, O., Topical methyl aminolaevulinate-photodynamic therapy in erosive facial mycosis fungoides. *The British journal of dermatology* **2010**, 163 (4), 884-885.
88. Recio, E. D.; Zambrano, B.; Alonso, M. L.; de Eusebio, E.; Martín, M.; Cuevas, J.; Jaen, P., Topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of unilesional mycosis fungoides: a report of two cases and review of the literature. *International journal of dermatology* **2008**, 47 (4), 410-413.
89. Mori, M.; Campolmi, P.; Mavilia, L.; Rossi, R.; Cappugi, P.; Pimpinelli, N., Topical photodynamic therapy for primary cutaneous B-cell lymphoma: a pilot study. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2006**, 54 (3), 524-526.
90. Abels, C., Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT). *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **2004**, 3 (8), 765-771.
91. Ud-Din, S.; Thomas, G.; Morris, J.; Bayat, A., Photodynamic therapy: an innovative approach to the treatment of keloid disease evaluated using subjective and objective non-invasive tools. *Archives of dermatological research* **2013**, 305 (3), 205-214.

92. Wan, M. T.; Lin, J. Y., Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology* **2014**, *7*, 145-163.
93. Hassani, J.; Feldman, S. R., Phototherapy in Scleroderma. *Dermatol Ther (Heidelb)* **2016**, *6* (4), 519-553.
94. Sakamoto, F. H.; Torezan, L.; Anderson, R. R., Photodynamic therapy for acne vulgaris: a critical review from basics to clinical practice: part II. Understanding parameters for acne treatment with photodynamic therapy. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2010**, *63* (2), 195-211; quiz 211-192.
95. Togsverd-Bo, K.; Wiegell, S. R.; Wulf, H. C.; Haedersdal, M., Short and limited effect of long-pulsed dye laser alone and in combination with photodynamic therapy for inflammatory rosacea. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* **2009**, *23* (2), 200-201.
96. Gong, Y.; Labh, S.; Jin, Y.; Diao, H. Y.; Li, X. L.; Liu, Z. Y.; Shi, Y. L., Needle-free injection of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy for the treatment of non-melanoma skin cancer. *Dermatologic therapy* **2016**, *29* (4), 255-262.
97. Gold, M. H.; Pope, A., Fractional resurfacing aiding photodynamic therapy of a recalcitrant plantar verruca: a case report and review of the literature. *J Clin Aesthet Dermatol* **2008**, *1* (1), 30-33.
98. Calzavara-Pinton, P. G.; Venturini, M.; Capezzer, R.; Sala, R.; Zane, C., Photodynamic therapy of interdigital mycoses of the feet with topical application of 5-aminolevulinic acid. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* **2004**, *20* (3), 144-147.
99. Sohl, S.; Kauer, F.; Paasch, U.; Simon, J. C., Photodynamic treatment of cutaneous leishmaniasis. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* **2007**, *5* (2), 128-130.
100. da Silva, N. S.; Ribeiro Cde, M.; Machado, A. H.; Pacheco-Soares, C., Ultrastructural changes in *Tritrichomonas foetus* after treatments with AlPcS4 and photodynamic therapy. *Veterinary parasitology* **2007**, *146* (1-2), 175-181.
101. Oniszczyk, A.; Wojtunik-Kulesza, K. A.; Oniszczyk, T.; Kasprzak, K., The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and clinical use. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2016**, *83*, 912-929.
102. Otsuji, T.; Sho, K.; Tsumura, A.; Koike, N.; Nishimura, T.; Takahashi, K., Three-year results of a modified photodynamic therapy procedure (Ironing PDT) for age-related macular degeneration patients with large lesions. *Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)* **2016**, *10*, 431.
103. Mody, T. D.; Sessler, J. L., Texaphyrins: a new approach to drug development. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2001**, *5* (02), 134-142.
104. O'Riordan, K.; Akilov, O. E.; Hasan, T., The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **2005**, *2* (4), 247-262.
105. Bertolini, G.; Rossi, F.; Valduga, G.; Jori, G.; Van Lier, J., Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* **1990**, *71* (1-2), 149-155.
106. Nitzan, Y.; Gutterman, M.; Malik, Z.; Ehrenberg, B., Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *Photochemistry and photobiology* **1992**, *55* (1), 89-96.
107. Minnock, A.; Vernon, D. I.; Schofield, J.; Griffiths, J.; Howard Parish, J.; Brown, S. B., Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1996**, *32* (3), 159-164.
108. Hurst, A. N.; Scarbrough, B.; Saleh, R.; Hovey, J.; Ari, F.; Goyal, S.; Chi, R. J.; Troutman, J. M.; Vivero-Escoto, J. L., Influence of Cationic meso-Substituted Porphyrins on the Antimicrobial

Photodynamic Efficacy and Cell Membrane Interaction in Escherichia coli. *International journal of molecular sciences* **2019**, *20* (1), 134.

109. Braun, A.; Tcherniac, J., The products of the action of acet-anhydride on phthalamide. *Ber. Dtsch. Chem. Ges* **1907**, *40* (2), 2709-2714.

110. Moussaron, A.; Arnoux, P.; Vanderesse, R.; Sibille, E.; Chaimbault, P.; Frochot, C., Lipophilic phthalocyanines for their potential interest in photodynamic therapy: synthesis and photo-physical properties. *Tetrahedron* **2013**, *69* (47), 10116-10122.

111. Schuster, C.; Kraus, M.; Opitz, A.; Brütting, W.; Eckern, U., Transport properties of copper phthalocyanine based organic electronic devices. *The European Physical Journal Special Topics* **2009**, *180* (1), 117-134.

112. Lin, C.-L.; Lee, C.-C.; Ho, K.-C., Spectroelectrochemical studies of manganese phthalocyanine thin films for applications in electrochromic devices. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2002**, *524-525*, 81-89.

113. Walter, M. G.; Rudine, A. B.; Wamser, C. C., Porphyrins and phthalocyanines in solar photovoltaic cells. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2010**, *14* (09), 759-792.

114. Nalwa, H. S.; Hanack, M.; Pawlowski, G.; Engel, M. K., Third-order nonlinear optical properties of porphyrazine, phthalocyanine and naphthalocyanine germanium derivatives: Demonstrating the effect of  $\pi$ -conjugation length on third-order optical nonlinearity of two-dimensional molecules. *Chemical Physics* **1999**, *245* (1), 17-26.

115. Kaliya, O. L.; Lukyanets, E. A.; Vorozhtsov, G. N., Catalysis and photocatalysis by phthalocyanines for technology, ecology and medicine. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **1999**, *3* (6-7), 592-610.

116. Sharman, W. M.; Van Lier, J. E., 97 - Synthesis of Phthalocyanine Precursors. In *The Porphyrin Handbook*, Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R., Eds. Academic Press: Amsterdam, 2003; pp 1-60.

117. Rosenthal, I., Phthalocyanines as photodynamic sensitizers. *Photochemistry and photobiology* **1991**, *53* (6), 859-870.

118. Snow, A. W., Phthalocyanine Aggregation 109. *The Porphyrin Handbook: Phthalocyanines: Properties and Materials* **2000**, *17*, 129.

119. Ali, H.; van Lier, J. E., Metal complexes as photo- and radiosensitizers. *Chemical reviews* **1999**, *99* (9), 2379-2450.

120. Li, X.; Zheng, B.-D.; Peng, X.-H.; Li, S.-Z.; Ying, J.-W.; Zhao, Y.; Huang, J.-D.; Yoon, J., Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: Developments in the last five years. *Coordination Chemistry Reviews* **2019**, *379*, 147-160.

121. Leznoff, C. C.; McKeown, N. B., Preparation of substituted tetrabenzotriazaporphyrins and a tetranaphthotriazaporphyrin: a route to mono-meso-substituted phthalocyanine analogs. *The Journal of organic chemistry* **1990**, *55* (7), 2186-2190.

122. Josefsen, L. B.; Boyle, R. W., Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer? *British journal of pharmacology* **2008**, *154* (1), 1-3.

123. Sokolov, V. V.; Chissov, V. I.; Yakubovskaya, R. I.; Aristarkhova, E.; Filonenko, E.; Belous, T.; Vorozhtsov, G. N.; Zharkova, N. N.; Smirnov, V.; Zhitkova, M. B. In *Photodynamic therapy (PDT) of malignant tumors by photosensitizer photosens: results of 45 clinical cases*, Photochemotherapy: Photodynamic Therapy and Other Modalities, International Society for Optics and Photonics: 1996; pp 281-287.

124. Filonenko, E. V.; Sokolov, V. V.; Chissov, V. I.; Lukyanets, E. A.; Vorozhtsov, G. N., Photodynamic therapy of early esophageal cancer. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **2008**, *5* (3), 187-190.

125. Miller, J. D.; Baron, E. D.; Scull, H.; Hsia, A.; Berlin, J. C.; McCormick, T.; Colussi, V.; Kenney, M. E.; Cooper, K. D.; Oleinick, N. L., Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: The case experience with preclinical mechanistic and early clinical–translational studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2007**, *224* (3), 290-299.
126. Kinsella, T. J.; Baron, E.; Colussi, V.; Cooper, K.; Hoppel, C.; Ingalls, S.; Kenney, M.; Li, X.; Oleinick, N.; Stevens, S., Preliminary clinical and pharmacologic investigation of photodynamic therapy with the silicon phthalocyanine photosensitizer Pc 4 for primary or metastatic cutaneous cancers. *Frontiers in oncology* **2011**, *1*, 14.
127. Yang, B.; Yao, H.; Liu, H.; Jiang, Z.; Wang, J.; He, W.; Wang, Y.; Chen, N.; Huang, J., Structural identification and quality study on isomers of a novel anticancer photosensitiser photocyanine. *Yao xue xue bao= Acta pharmaceutica Sinica* **2010**, *45* (12), 1545-1549.





---

# Capítulo 2

---

## Síntesis y caracterización de ftalocianinas

2.1	Introducción .....	37
2.2	Objetivos .....	41
2.3	Resultados y discusión.....	43
2.3.1	Síntesis de ftalonitrilos sustituidos .....	43
2.3.2	Síntesis de subftalocianinas (SubPc) .....	45
2.3.3	Síntesis de ftalocianinas .....	46
2.4	Conclusiones.....	51
2.5	Sección experimental .....	53
2.5.1	Equipamiento .....	53
2.5.2	Reactivos .....	54
2.5.3	Modificación de ftalonitrilos.....	54
2.5.4	Síntesis de subftalocianinas (SubPc) .....	56
2.5.5	Síntesis de ftalocianinas .....	57
2.6	Bibliografía.....	60



## 2.1 Introducción

Como se mencionó en el capítulo anterior, las ftalocianinas (Pcs) son heterociclos aromáticos que consisten en cuatro anillos isoindol unidos por átomos de nitrógeno.<sup>1</sup> Cuando esos cuatro anillos son idénticos, se generan Pcs de la forma  $A_4$  (Figura 1). Si las subunidades varían, se generan Pcs de la forma  $A_2B_2$  o  $A_3B$ .<sup>2</sup> Las ftalocianinas pueden contener un átomo metálico central coordinado que mejoran las propiedades fotodinámicas de la molécula, es decir, el rendimiento de generación de oxígeno singlete y el tiempo de vida en el estado triplete.<sup>3</sup>

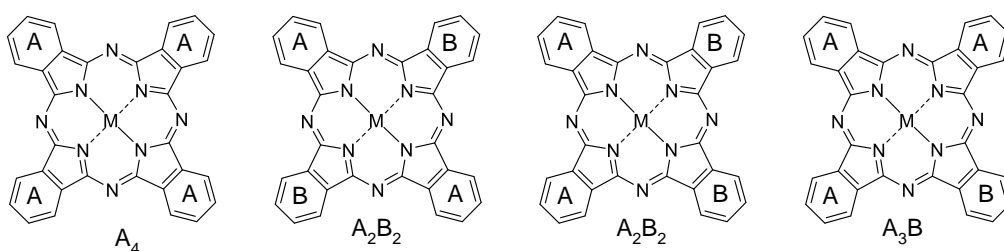


Figura 1: Pcs simétrica  $A_4$  y Asimétricas  $A_2B_2$  (dos isómeros) y  $A_3B$ .

Las Pcs, pueden sintetizarse a partir de derivados de ácidos aromáticos dicarboxílicos ubicados en la posición *orto*, incluyendo ácido ftálico, ftalonitrilos, anhídridos ftálicos, ftalimidas, diiminoisoindolinas y *orto*-ciano benzamidas (Figura 2). Las síntesis que utilizan precursores como los anhídridos ftálicos y las ftalimidas requieren la presencia de una fuente de nitrógeno como urea y un catalizador como el molibdato de amonio o el ácido bórico para lograr la formación de ftalocianina.<sup>4</sup>

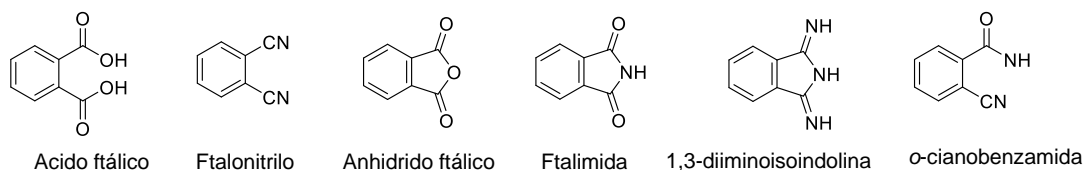


Figura 2. Estructura química de los diversos precursores de ftalocianinas

Las ftalocianinas simétricas ( $A_4$ ), son fácilmente sintetizadas por reacción de ciclotetramerización. Las Pcs asimétricas del tipo  $A_3B$  generalmente son difíciles de obtener. Diferentes estrategias se utilizan para sintetizar este tipo de Pcs. El método más común es la reacción entre dos ftalonitrilos o 1,3-Diiminoisoindolinas, A y B, diferentes y, posteriormente, un complicado proceso de purificación.<sup>5,6</sup>

Kobayashi et al.<sup>7</sup> desarrollaron un método para la preparación de Pcs A<sub>3</sub>B mediante la reacción de apertura de anillo del macrociclo subftalocianina (SubPc) (A<sub>3</sub>) en presencia de derivados de 1,3-diiminoisindolina (B) y el posterior cierre de anillo al macrociclo de cuatro miembros más estable.<sup>8,9</sup> En algunos casos, se utilizan ftalonitrilos que se *activan in situ* en presencia de una base como 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU)<sup>8,9,10</sup> (Figura 3). Este método permite rendimientos razonables y alta selectividad para la formación de A<sub>3</sub>B, lo que simplifica el proceso de purificación.

La síntesis de A<sub>3</sub>B a partir de SubPc se lleva a cabo comúnmente en solventes polares, como dimetilsulfóxido (DMSO) o *N,N*-dimetilaminoetanol (DMAE), aunque en algunos casos se emplean 1-cloronaftaleno u *o*-diclorobenceno como cosolventes para mejorar la solubilidad de todos los reactivos.

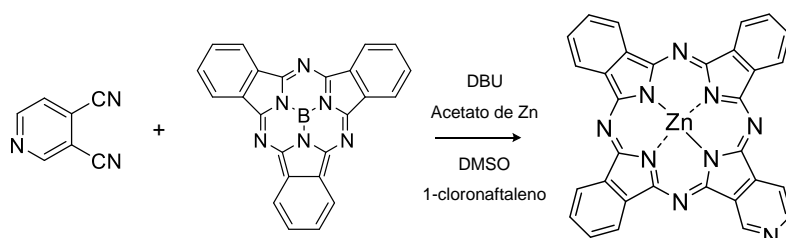


Figura 3. Síntesis de ftalocianinas asimétricas A<sub>3</sub>B a partir de la expansión de SubPc con un ftalonitrilo

El descubrimiento de las subftalocianinas fue realizado en 1972 por Meller y Ossko,<sup>11</sup> cuando intentaban obtener boroftalocianina; la reacción del ftalonitrilo en presencia de tricloruro de boro en 1-cloronaftaleno a 200 ° C no condujo al producto de ciclotrimerización esperado.

Las subftalocianinas están compuestas por tres anillos de 1,3-diiminoisindol N-fusionados alrededor de un núcleo de boro. Su núcleo aromático de 14 p-electrones junto con su estructura en forma de cono no plana, los hacen compuestos atractivos debido a sus propiedades químicas y físicas. Las subftalocianinas se sintetizan por reacción de ciclotrimerización de precursores de ftalonitrilo en presencia de un trihaluro de boro (Figura 4).<sup>5,12,13</sup>

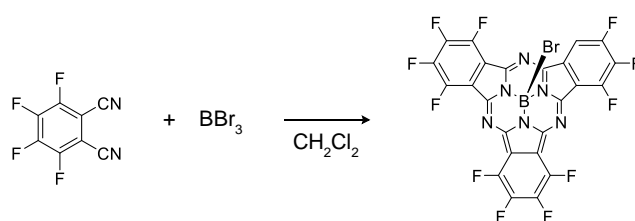


Figura 4. Síntesis de Subftalocianina asistida por  $BBr_3$

En la síntesis de ftalocianinas, los métodos convencionales de calentamiento utilizan altas temperaturas con tiempos de reacción más largos y conducen a mayor cantidad de subproductos, lo que resulta en una purificación difícil.<sup>14</sup> Varios trabajos han estudiado la utilización de la irradiación de microondas para reacciones orgánicas,<sup>14,15</sup> esta posee distintas ventajas frente al calentamiento convencional tales como, condiciones de reacción suaves, calentamiento homogéneo, relativamente menos subproductos y menos descomposición de los reactivos.<sup>16</sup> Por lo que, la síntesis rápida de ftalocianinas con irradiación de microondas ha atraído mucha atención en los últimos años con respecto a los largos tiempos de reacción y las temperaturas muy altas requeridas en las rutas sintéticas tradicionales a las ftalocianinas.<sup>17,18,19</sup> La irradiación con microondas también se ha aplicado a la síntesis de SubPc.<sup>14</sup> En este caso, se añade  $BCl_3$  como gas a una solución del ftalonitrilo en 1-cloronaftaleno antes de la irradiación.<sup>8</sup>

Si bien hay diferentes precursores (Figura 1), los más utilizados en la síntesis de ftalocianinas, son los ftalonitrilos ya que generan Pcs fácilmente y con buenos rendimientos por ciclotetramerización asistida con un metal. Estas reacciones se llevan a cabo a temperaturas elevadas generando la fusión de reactivos o en un disolvente de alto punto de ebullición y en presencia de una base orgánica como DBU, piperidina o ciclohexilamina, esto permite que la reacción se desarrolle en condiciones más suaves al actuar estas bases como aceptores de electrones (Figura 5).<sup>2,20,21,22</sup> Las reacciones que involucran ftalonitrilos son generalmente mucho más limpias que aquellas que emplean otros precursores y dan los mejores rendimientos, típicamente en el rango de 30-50% y ocasionalmente tan alto como 90%.<sup>2</sup>

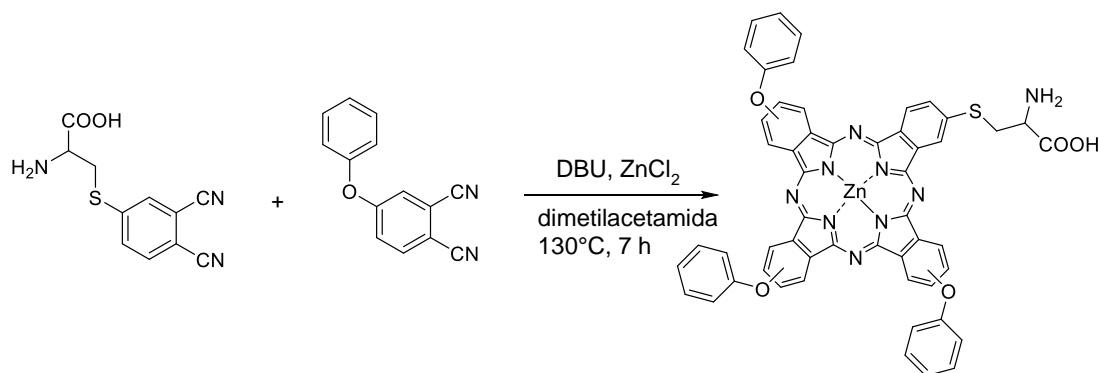


Figura 5. Síntesis de Pc a partir de ftalonitrilos utilizando DBU como base.

Ftalonitrilos modificados, generan diversas Pcs. La forma más simple de preparar ftalonitrilos sustituidos es a través de la modificación de ftalonitrilos preexistentes. Las reacciones más utilizadas en la modificación de los ftalonitrilos sustituidos son las de sustitución nucleofílica aromática cuando los grupos salientes apropiados están presentes en la molécula.<sup>2</sup>

Diferentes nucleófilos y grupos salientes han sido utilizados en la síntesis de ftalonitrilos sustituidos. El grupo nitro (NO<sub>2</sub>) es un buen grupo saliente para reacciones de sustitución nucleofílica, y emplean tanto 4- como 3-nitroftalonitrilo.<sup>23,24,25</sup>

Numerosos trabajos se llevaron a cabo empleando como grupo saliente NO<sub>2</sub>, y varios alcoholes como nucleófilo. Estas reacciones generalmente se desarrollan en solvente seco, polar y aprótico como *N,N*-dimetilformamida (DMF) o DMSO usando carbonato de sodio o potasio como base (Figura 6).<sup>25</sup> Los tioles también son nucleófilos efectivos en reacciones de sustitución nucleofílica aromática. Las aminas no son muy utilizadas a pesar de que se comoce que el 3 y/o 4-nitroftalonitrilo reacciona aceptablemente con amoníaco y aminas primarias y secundarias para conducir a las correspondientes arilaminas. Esto puede deberse a que los 3 y 4-aminofthalonitrilos se sintetizan sin mayores dificultades mediante la reducción de los nitro compuestos y se pueden transformar fácilmente en ftalonitrilos que contienen sustituyentes amina y amida.<sup>2</sup>

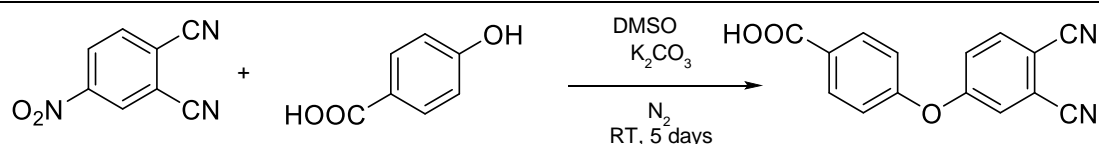


Figura 6. Modificación de 4-nitroftalonitrilo por sustitución nucleofílica aromática

La aplicación principal de 3 y 4-aminofthalonitrilo, es formar derivados sustituidos a través de sales de diazonio. La diazotación se logra usando condiciones tradicionales tratando el 4-aminofthalonitrilo con nitrito de sodio en medios ácidos. El grupo diazonio es un excelente grupo saliente y puede ser reemplazado por un gran número de posibles sustituyentes (Figura 7).<sup>2,26,27</sup>

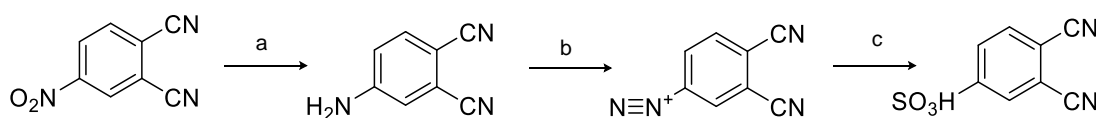


Figura 7. Reducción de 4-nitroftalonitrilo, para obtener 4-aminoftalonitrilo y la correspondiente sal de diazonio, intermediario de reacción para obtener ftalonitrilos modificados. a) H<sub>2</sub>, 10% Pd/C, 95% EtOH; b) NaNO<sub>2</sub>, 2.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; c) SO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>COOH, CuCl, H<sub>2</sub>O.

El 4-iodoftalonitrilo, también puede obtenerse a partir de la respectiva sal de diazonio y es el sustrato de muchas reacciones de sustitución, de hecho, se aplica en reacciones de sustitución nucleofílica radicalaria (Figura 8).<sup>28</sup>

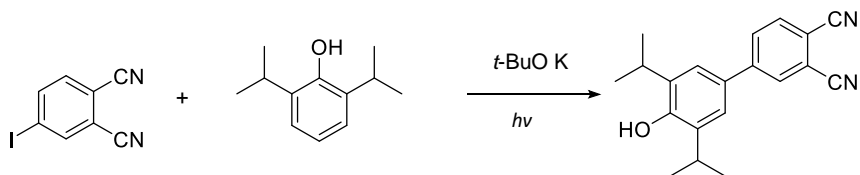


Figura 8. Sustitución nucleofílica radicalaria fotoinducida de 4-iodoftalonitrilo con 2,6-diterbutilfenol

La sustitución nucleofílica radicalaria fotoinducida puede ser considerada una ruta alternativa para la formación de enlaces carbono-carbono. Este tipo de reacciones se utilizan en la síntesis de moléculas orgánicas complejas, que se desarrollan en condiciones suaves y toleran sustratos con muchos grupos funcionales.<sup>29</sup> En ellas, un nucleófilo se combina con un radical arilo para conducir al producto de acoplamiento correspondiente. Tradicionalmente, los sustratos, haluros de arilo, originan el radical arilo luego de la transferencia de un electrón, desde el nucleófilo fotoexcitado, y la posterior pérdida de halogenuro. Los radicales así formados pueden reaccionar con el nucleófilo para conducir al anión radical del producto de sustitución.<sup>28</sup> Este tipo de reacciones, permiten modificar ftalonitrilos manteniendo el grupo funcional del nucleófilo, como es el caso, por ejemplo de alcoholes o aminas, ya que como se mencionó anteriormente, las uniones son C-C, el C que poseía el iodo en el ftalonitrilo y el C adyacente a la posición del OH o NH<sub>2</sub> del nucleófilo.<sup>28</sup>

Los procedimientos anteriormente descriptos son un resumen de las metodologías empleadas para la síntesis de ftalocianinas, y muchos de ellos se aplicaron en el desarrollo de esta tesis doctoral.

## 2.2 Objetivos

Como se mencionó en la introducción general de la Tesis, al variar el número y tipo de sustituyentes de las ftalocianinas se logran distintas interacciones con células (tanto bacterianas como eucariotas). Por lo tanto, el objetivo general de este capítulo es “Síntetizar Zn-ftalocianinas simétricas y asimétricas con diversidad estructural y de cargas, aplicando diferentes metodologías”.

El interés en obtener diversidad de ftalocianinas, radica en establecer relaciones entre las diferencias estructurales; es decir, analizar cómo influye el número y el tipo de sustituyentes y la presencia o no de cargas, tanto en las propiedades fotofísicas como en la aplicación de estos fotosensibilizadores en Terapia Fotodinámica y Terapia Fotodinámica Antimicrobiana.

Para alcanzar el objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Modificar ftalonitrilos a través de reacciones de sustitución nucleofílica, a fin de obtener derivados con sustituyentes capaces de soportar cargas positivas o negativas.
- Sintetizar subftalocianinas como precursores de ftalocianinas asimétricas del tipo A<sub>3</sub>B.
- Sintetizar Zn-ftalocianinas simétricas y asimétricas con distinto número y tipo de sustituyentes utilizando como precursores, ftalonitrilos y SubPcs, previamente obtenidos.



## 2.3 Resultados y discusión

### 2.3.1 Síntesis de ftalonitrilos sustituidos

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, una forma de sintetizar ftalocianinas es a partir de ftalonitrilos. La mayor diversidad de ftalonitrilos permite obtener ftalocianinas con una variada diversidad estructural, por ello, nuestro primer objetivo fue obtener ftalonitrilos sustituidos, aplicando para ello reacciones de sustitución nucleofílica radicalaria fotoinducida y de sustitución nucleofílica aromática polar.

#### 2.3.1.1 Síntesis de 4-iodoftalonitrilo

En una primera etapa se obtuvo 4-iodoftalonitrilo (**3**) aplicando la metodología ya reportada;<sup>30</sup> a partir de la diazotación del 4-aminoftalonitrilo (**1**) y la posterior sustitución del grupo diazo por yodo (ver Figura 9), el rendimiento de la reacción fue del 72%.

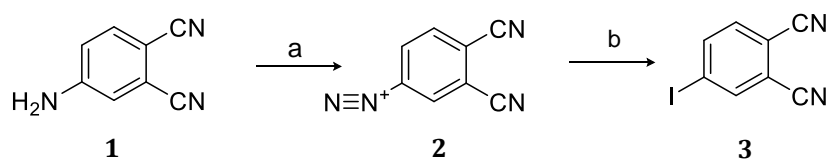
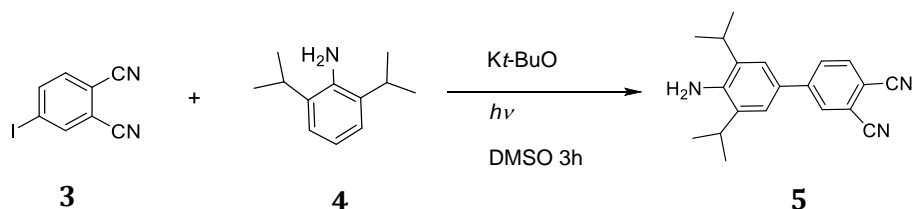


Figura 9. Síntesis de 4-iodoftalonitrilo. a)  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{HCl}$ ,  $< 5^\circ\text{C}$ , 1,5 h. b)  $\text{KI}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 h.

#### 2.3.1.2 Síntesis de ftalonitrilos aplicando reacciones de sustitución nucleofílica radicalaria fotoinducida.

En las reacciones de sustitución nucleofílica radicalaria fotoinducida, el sustrato utilizado es 4-iodoftalonitrilo (**3**), cuyo grupo saliente es yoduro, siendo el producto final un biarilo resultado de la formación de un enlace C-C.

Ecuación 1



4-(2,6-diisopropil-1-amino-fenil)ftalonitrilo (**5**), se sintetizó a partir de **3** y 2,6-diisopropil-anilina (**4**) en presencia de *tert*-butóxido de potasio (*Kt*-BuO) (Ecuación 1). Se

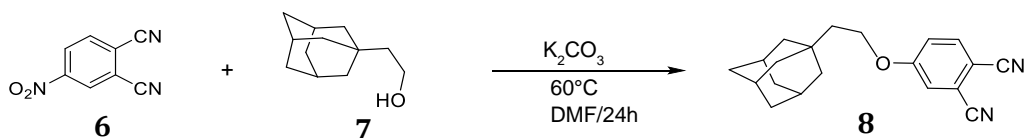
determinó el porcentaje de deshalogenación del sustrato, por potenciometría, obteniendo el 54%. El compuesto **5** fue aislado en un 15% por columna cromatográfica del 15%.

### 2.3.1.3 Síntesis de ftalonitrilos: reacciones de sustitución nucleofílica polar

En las reacciones de sustitución nucleofílica polar, el sustrato es 4-nitroftalonitrilo (**6**) y el grupo saliente es el nitro (NO<sub>2</sub>) siendo el producto final el correspondiente al acople a través del heteroátomo del nucleófilo.<sup>2</sup> Se utilizaron como nucleófilos dos tiopiridinas, 2 y 4-tiopiridina, y el alcohol 1-adamantiletanol.

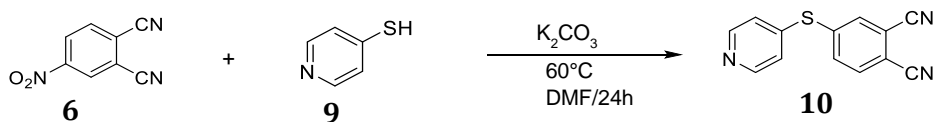
El producto de sustitución 4-(1-adamantiletoksi)ftalonitrilo (**8**), se obtuvo por reacción del sustrato **6** con 1-adamantiletanol (**7**), en presencia de una base como carbonato de potasio (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (Ecuación 2). Posteriormente se purificó mediante columna cromatográfica y se obtuvo un rendimiento aislado de 32%.

Ecuación 2



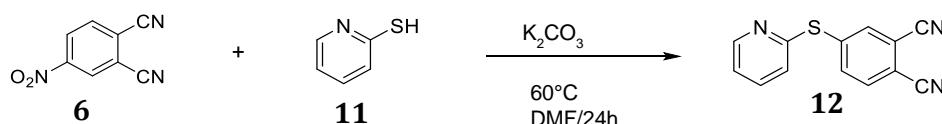
4-(piridin-4-tio)ftalonitrilo (**10**), se sintetizó a partir de **6** y 4-tiopiridina (**9**), en similares condiciones a las aplicadas en la Ecuación 2. El sólido obtenido se purificó por columna cromatográfica, presentando un rendimiento aislado del producto final de 50% (Ecuación 3).

Ecuación 3



El producto de sustitución, cambiando la posición del N correspondiente a la piridina 4-(piridin-2-tio)ftalonitrilo (**12**), se obtuvo al reaccionar **6** con 2-tiopiridina (**11**) en presencia de base,  $K_2CO_3$  (Ecuación 4). Finalizada la reacción, se vierte en agua Milli-Q previamente enfriada, obteniendo un precipitado blanco correspondiente al producto de sustitución con un rendimiento del 86%.

Ecuación 4



### 2.3.2 Síntesis de subftalocianinas (SubPc)

Las SubPcs se sintetizaron con el fin de obtener ftalocianinas asimétricas del tipo  $A_3B$ , la síntesis se realizó en microondas (mw) a partir de ftalonitrilos.<sup>8,12</sup> Se sintetizaron dos SubPcs, una a partir del compuesto **6** y otra a partir del ftalonitrilo (**14**) (sin sustituyentes), los resultados se observan en la Tabla 1.

Tabla 1. Síntesis de Subftalocianinas

SubPc	Ftalonitrilo	$BCl_3$ (mmoles)	1-cloronaftaleno	Rendimiento	Rendimiento aislado
TriNSubPc <b>13</b> <sup>(a)</sup>	<b>6</b> 1,5 mmol	$4,5 \cdot 10^{-4}$	3 mL	34%	--
SubPc <b>15</b> <sup>(a)</sup>	<b>14</b> 1,5 mmol	$4,5 \cdot 10^{-4}$	3 mL	78%	38%
SubPc <b>15</b> <sup>(b)</sup>	<b>14</b> 5 mmol	$7,5 \cdot 10^{-4}$	12 mL	91%	63%

<sup>(a)</sup> Condiciones de mw: sistema cerrado, potencia 100w, temperatura 150°C, tiempo 1,5h y agitación constante.

<sup>(b)</sup> Condiciones de mw: sistema cerrado, potencia variable, temperatura 200°C, tiempo 10 min y agitación constante.

La síntesis de la SubPc tri sustituida, Tri-Nitro-Subftalocianina (TriNSubPc) (**13**), se realizó a partir de **6** y  $BCl_3$  (Ecuación 5). Finalizada la reacción, se obtuvo un sólido color violeta. El rendimiento general de la reacción fue 34% y se utilizó sin posterior purificación.

El producto SubPc (**15**) se obtuvo por reacción de ciclotrimerización del ftalonitrilo **14** en presencia de  $BCl_3$  (Ecuación 5). Finalizada la reacción, se obtuvo un producto color violeta. Estas reacciones se llevaron a cabo en dos condiciones diferentes. Cuando la síntesis se realizó bajo las condiciones de sistema cerrado, potencia 100w, 150°C, 1,5h y agitación constante, se obtuvo gran cantidad de subproductos; la purificación se realizó por cromatografía en columna y el rendimiento aislado fue de 38%. Mientras que el producto

sintetizado bajo condiciones de sistema cerrado, potencia variable, 200°C, 10 min y agitación constante condujo a menor cantidad de subproductos, la purificación se llevó a cabo realizando lavados con tetrahidrofurano (THF), obteniendo un rendimiento aislado del 63%.

Ecuación 5



### 2.3.3 Síntesis de ftalocianinas

Este capítulo, tiene como objetivo principal “Síntetizar Zn-ftalocianinas simétricas y asimétricas con diversidad estructural y de cargas, aplicando diferentes metodologías”; por ello, se sintetizaron Pcs simétricas a partir de distintos precursores, ftalonitrilos o ácido 2,3-piridindicarboxílico; y Pcs asimétricas del tipo A<sub>3</sub>B por expansión de las SubPcs. Además, se realizaron modificaciones de los grupos periféricos de algunas de las Pcs sintetizadas, con el fin de obtener mayor diversidad y generar Pcs catiónicas a través de reacciones de metilación.

#### 2.3.3.1 Síntesis de ftalocianinas simétricas a partir de ftalonitrilos.

Se obtuvieron tres Pcs simétricas por ciclotetramerización de tres ftalonitrilos diferentes. Las reacciones se realizaron asistidas por microondas y se obtuvieron rendimientos aislados de moderados a buenos. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

 Tabla 2. Síntesis de Pcs simétricas asistida por mw<sup>a</sup>

Pc	Ftalonitrilo	ZnAc (mmol)	DBU (mmol)	DMF	Rendimiento aislado
ZnPc <b>16</b>	<b>14</b> 2 mmol	0,55	3,35	3 mL	75%
TNZnPc <b>17</b>	<b>6</b> 2 mmol	0,55	3,35	3 mL	70%
TPySZnPc <b>18</b>	<b>12</b> 1 mmol	0,30	2,00	3 mL	43%

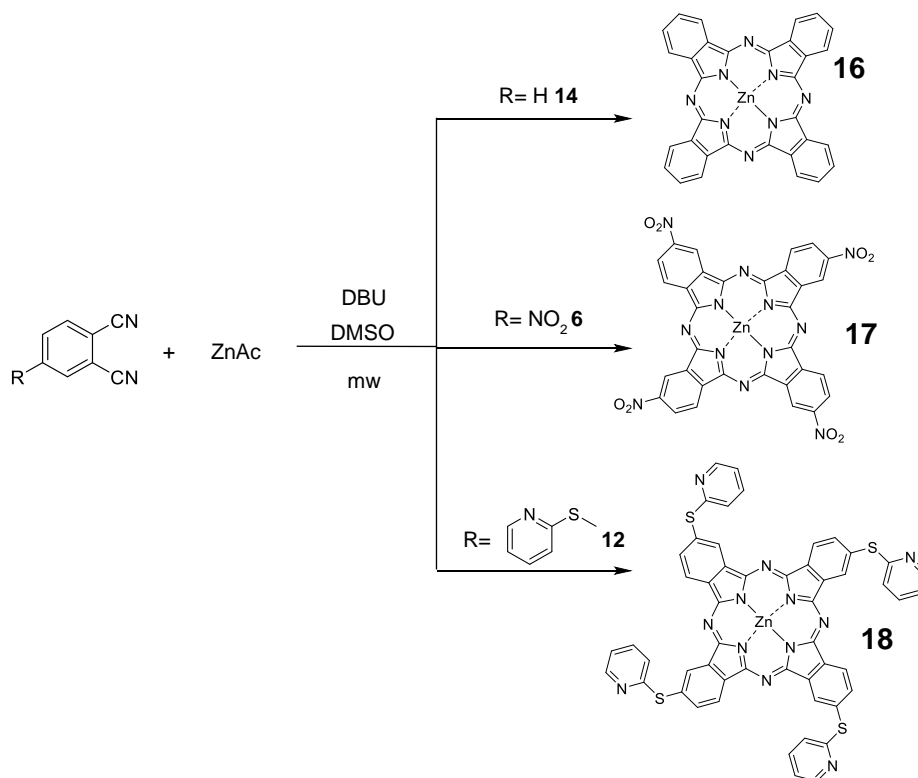
<sup>a</sup> Condiciones de mw: Sistema cerrado, potencia 100w, 150°C durante 2h.

La Pc que no posee sustituyentes, Zinc(II)ftalocianina (ZnPc) (**16**), se obtuvo como producto de tetramerización de **14**, en presencia de ZnAc, DMF y DBU (ver Esquema 1). Una vez obtenido el sólido verde-azulado, se realizaron lavados con acetona para eliminar impurezas, obteniéndose un rendimiento aislado del 75%.

Zn(II)tetranitroftalocianina (TNZnPc) (**17**), se sintetizó a partir de **6**, ZnAc, DMF y DBU (ver Esquema 1). Finalizada la reacción, y obtenido un sólido verde, se realizaron lavados con diclorometano para eliminar impurezas. El rendimiento aislado obtenido fue del 70%.

Por último, para la síntesis de Zinc(II) tetra-4-(piridil-2-tio)ftalocianina (TPySZnPc) (**18**), se colocaron en un tubo de reacción 4-(piridin-2-tio)ftalonitrilo (**12**), ZnAc, DMF y DBU. Finalizada la reacción se obtuvo un sólido verde con un rendimiento aislado de 43% por cromatografía en columna.

Esquema 1. Síntesis de Pcs simétricas a partir de ftalonitrilos, asistida por mw<sup>a</sup>

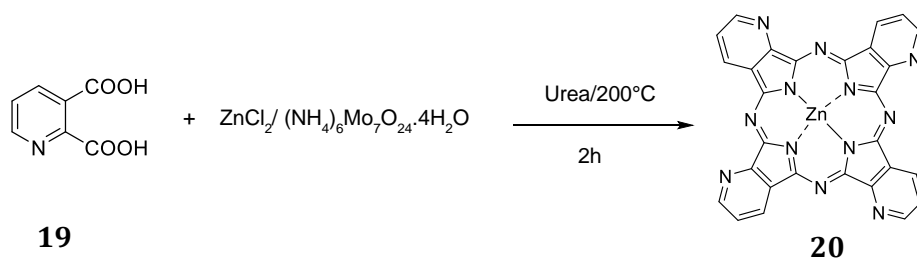


<sup>a</sup> Condiciones de mw: Sistema cerrado, potencia 100w, 150°C durante 2h.

2.3.3.2 Síntesis de ftalocianina simétrica partiendo de ácido 2,3-piridindicarboxílico.

La síntesis de Zinc(II)-2,3-piridinporfirazina (Zn2,3PyPz) (**20**), se llevó a cabo mediante la ciclotetramerización del ácido 2,3-piridindicarboxílico (**19**) utilizando calentamiento convencional (Ecuación 6). La síntesis se realizó utilizando ZnCl<sub>2</sub>, urea, molibdato de amonio y el compuesto **19**. Una vez finalizada la reacción, se obtuvo un sólido de color verde, que se purificó precipitando la Pc en agua básica. El precipitado se centrifugó y se secó con vacío, obteniendo un rendimiento aislado de 72%.

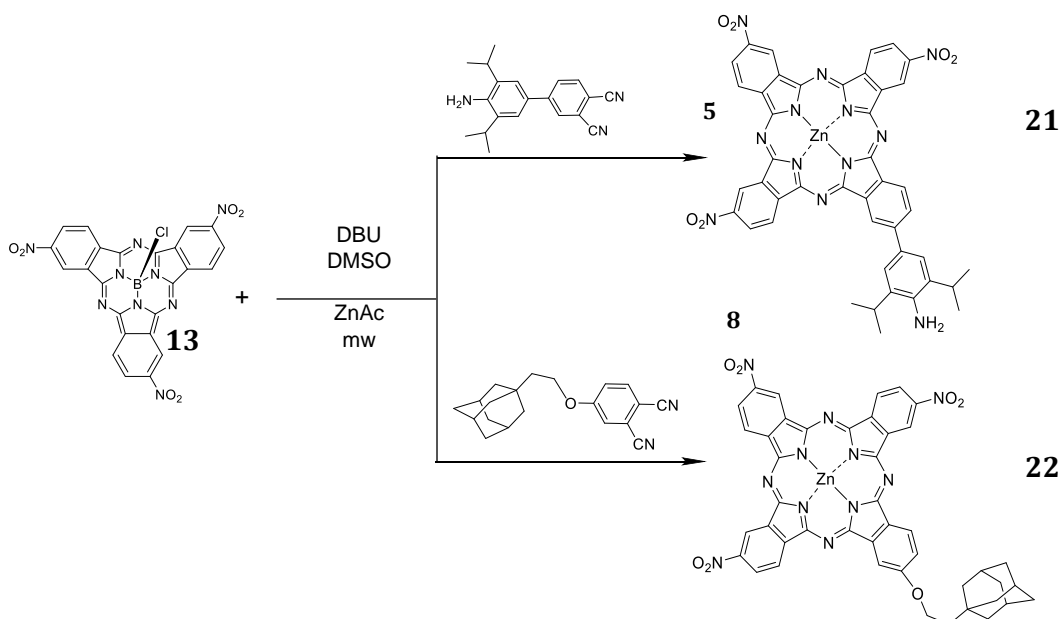
Ecuación 6



2.3.3.3 Síntesis de ftalocianinas asimétricas A<sub>3</sub>B

La síntesis de ftalocianinas asimétricas, se realizó asistida por mw y calentamiento convencional a partir de la reacción entre SubPcs sintetizadas anteriormente con un ftalonitrilo.

Esquema 2. Síntesis de Pc A<sub>3</sub>B, a partir de TriNSubPc asistida por mw<sup>a</sup>



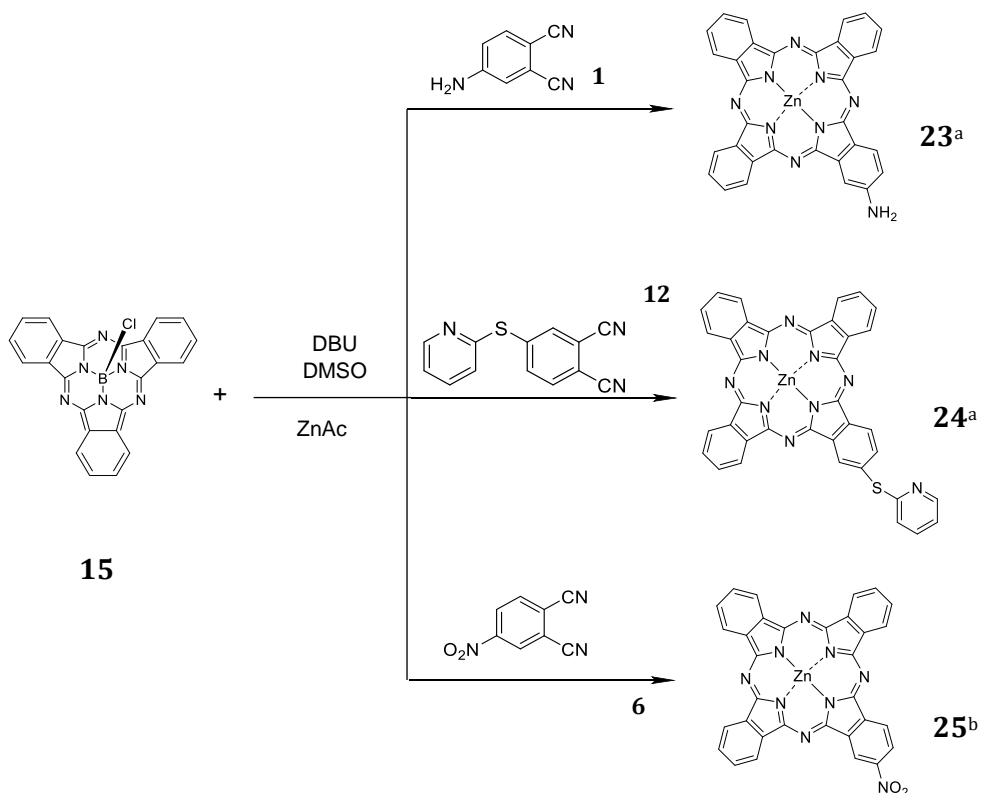
<sup>a</sup> Condiciones de mw: Sistema cerrado, potencia 100w, 150°C durante 2h.

Se sintetizaron 5 Pcs asimétricas (ver Esquema 2 y 3). En el Esquema 2 se muestra la síntesis dos Pcs, por reacción de expansión de TriNSubPc (**13**) con ftalonitrilos, utilizando calentamiento por microondas. El compuesto **21** Zinc(II)4-(2,6-diisopropil-1-amino-fenil-trinitroftalocianina (MDIATriNZnPc), se obtuvo por expansión con 4-(2,6-diisopropil-1-amino-fenil)ftalonitrilo (**5**) con un rendimiento global de 39%; El compuesto **22** Zinc(II)4-(adamantiletoxi)-trinitroftalocianina (MAdTriNZnPc), se obtuvo por expansión con 4-(1-adamantiletoxi)ftalonitrilo (**8**) con un rendimiento global de 47%. Debido al bajo rendimiento de la síntesis, estos compuestos no se purificaron.

Los derivados Zinc(II)monoaminoftalocianina (MAZnPc) (**23**) y Zinc(II)monotio2-piridinftalocianina (MTPZnPc) (**24**) se obtuvieron por reacción en mw, a partir de la expansión de SubPc **15** con 4-aminoftalonitrilo (**1**) y 4-(piridin-2-tio)ftalonitrilo (**12**), respectivamente (Esquema 3).

La síntesis de Zinc(II)mononitroftalocianina (MNZnPc) (**25**) se realizó con calentamiento convencional y se obtuvo a partir de SubPc (**15**) con **6**, ZnAc, DMF, DBU a 175°C. (Esquema 3) Al finalizar la reacción, se obtuvo un sólido de color verde.

Esquema 3. Síntesis de Pcs asimétricas del tipo A<sub>3</sub>B, por expansión de SubPc con ftalonitrilo. Asistida por mw<sup>a</sup> o por calentamiento convencional<sup>b</sup>



<sup>a</sup> Condiciones de mw: Sistema cerrado, potencia 150w, agitación, 150°C durante 2h.

<sup>b</sup> Calentamiento convencional: 175°C con agitación por 24h

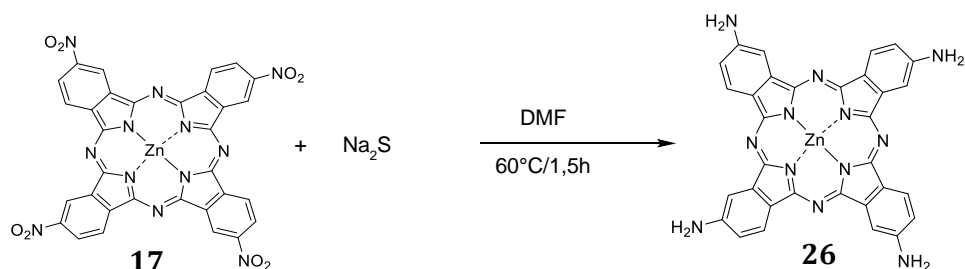
Con el objetivo de purificar MAZnPc (**23**), MTPZnPc (**24**) y MNZnPc (**25**) se realizó cromatografía en columna con silica gel. Las fases móviles se determinaron por TLC. En los tres casos se logró una buena separación con una mezcla de pentano:acetona:THF (70:10:20, respectivamente). Los rendimientos aislados fueron (**23**) 30%, (**24**) 35% y (**25**) 40%, respectivamente.

#### 2.3.3.4 Modificaciones en los grupos periféricos

Otra alternativa para obtener diferentes Pcs, es modificar los grupos funcionales que contiene en la periferia, a través de diferentes reacciones. En esta sección, se evaluó la modificación de grupos periféricos por reacciones de reducción y metilación. Las reacciones de metilación, generan ftalocianinas cargadas positivamente.

Zinc(II)tetraaminoftalocianina (TAZnPc) (**26**) se sintetizó a partir de la reducción de TNZnPc (**17**)<sup>31</sup> con NaS<sub>2</sub> en exceso (Ecuación 7). Una vez finalizada la reacción, el producto se vierte sobre agua Milli-Q previamente enfriada, provocando así, la precipitación de la ftalocianina. El rendimiento de la reacción fue de 77%.

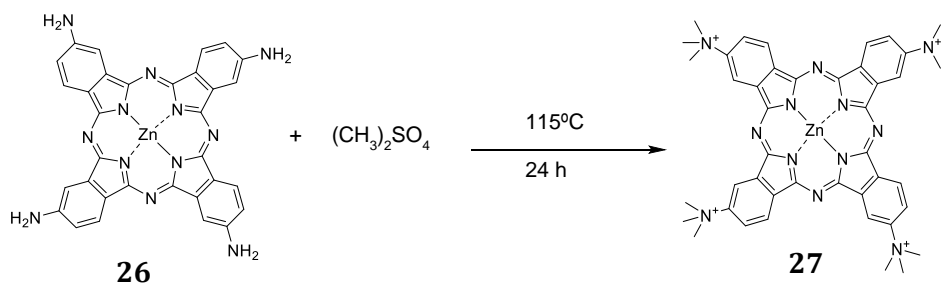
Ecuación 7



Zinc(II)tetra(*N,N,N*-trimetilamino)ftalocianina (TMAZnPc) (**27**), una Pc tetra catiónica, se obtuvo por metilación exhaustiva del grupo amino de TAZnPc (**26**) con sulfato de dimetilo (Ecuación 8). Rendimiento de la reacción: 38%.

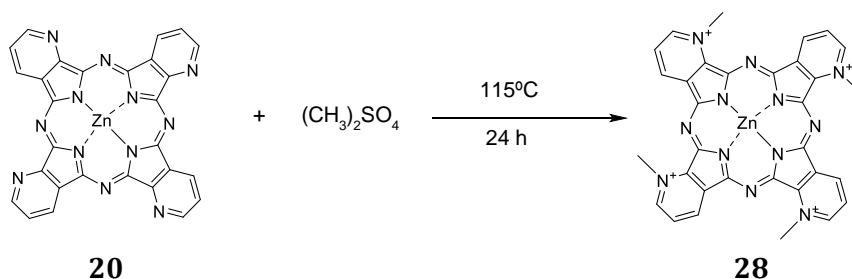


Ecuación 8



Zinc(II)tetrametil-2,3-piridinporfirazina (ZnTM2,3PyPz) (**28**), Pc tetracatiónica soluble en agua, se obtuvo por metilación de los N de piridina presentes en el anillo de las Pcs.<sup>32</sup> Se sintetizó a partir de Zn2,3PyPz (**20**) y sulfato de dimetilo (Ecuación 9). Rendimiento del producto aislado: 46%.

Ecuación 9



## 2.4 Conclusiones

Se sintetizó el ftalonitrilo (**5**) por sustitución nucleofílica radicalaria fotoinducida con Iodo como grupo saliente.

Las reacciones de sustitución nucleofílica aromática polar con NO<sub>2</sub> como grupo saliente, se obtuvieron como producto 3 ftalonitrilos modificados con rendimientos que van de moderados a buenos (**8**), (**10**) y (**12**).

Se sintetizaron SubPcs, asistida con mw, como precursores de Pcs asimétricas del tipo A<sub>3</sub>B. Se obtuvieron dos SubPcs diferentes al variar el ftalonitrilo que se utilizó en la síntesis, SubPc que no posee sustituyentes; y TriNSubPc, que posee tres sustituyentes NO<sub>2</sub> en la periferia.

Con relación a la síntesis de Pcs, se obtuvo un total de doce Pcs con diferentes sustituyentes, cinco de las cuales son asimétricas de la forma A<sub>3</sub>B. Se sintetizaron tres Pcs simétricas, por ciclotetramerización de los ftalonitrilos **(16)**, **(17)** y **(18)**, aplicando calentamiento por mw y con rendimientos aislados que van de moderado a buenos. Por calentamiento convencional a partir del ácido 2,3-piridindicarboxílico se obtuvo el compuesto **(20)** con buen rendimiento aislado. Por modificación de grupos periféricos se obtuvo la Pc **(26)** por reacción de reducción. Dos Pcs tetracatiónicas se obtuvieron por reacción de metilación, una soluble en agua **(28)** y la otra liposoluble **(27)**.

Las Pcs asimétricas se obtuvieron por expansión de SubPcs, sintetizadas previamente, con ftalonitrilos. A partir de TriNSubPc por expansión con los ftalonitrilos **(5)** y **(8)** se sintetizaron dos Pcs **(21)** y **(22)** respectivamente, con rendimientos globales muy bajos.

Las tres Pcs restantes **(23)**, **(24)** y **(25)** se sintetizaron a partir de la expansión de SubPc **(15)**, con tres ftalonitrilos diferentes **(1)**, **(12)** y **(6)** respectivamente, con rendimientos moderados.

## 2.5 Sección experimental

### 2.5.1 Equipamiento

#### 2.5.1.1 Fotorreactor

Las reacciones fotoestimuladas se llevaron a cabo en un fotorreactor equipado con dos lámparas Hg de alta presión (modelo Philips HPI-T plus) de 400 W. En la Figura 10 se muestra el espectro de emisión de la lámpara.

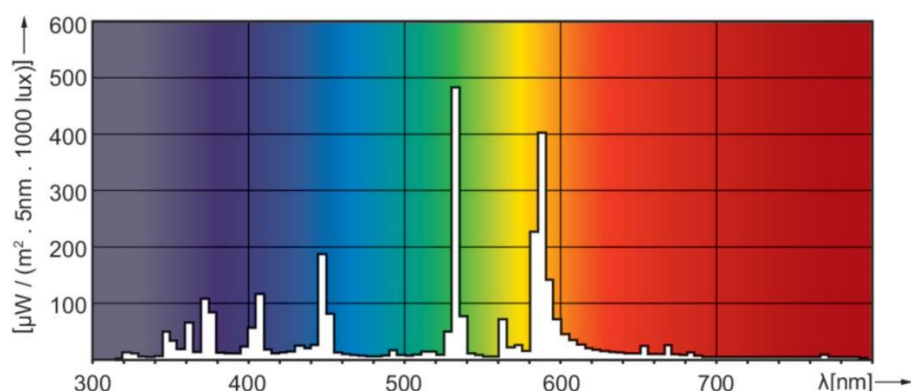


Figura 10. Espectro de emisión de la lámpara Philips HPI-T plus

#### 2.5.1.2 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de  $^1\text{H}$ NMR (400 MHz) fueron obtenidos en un espectrómetro Bruker Avance II utilizando  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ , Acetona- $\text{d}_6$  y  $\text{DMSO-d}_6$  como solvente. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están expresados en ppm empleando la señal residual del solvente como referencia.  $\text{CDCl}_3$ :  $\delta\text{H} = 7,26$  ppm,  $\text{D}_2\text{O}$ :  $\delta\text{H} = 4,79$  ppm, Acetona- $\text{d}_6$ :  $\delta\text{H} = 2,05$  ppm y  $\text{DMSO-d}_6$ :  $\delta\text{H} = 2,50$  ppm.

#### 2.5.1.3 Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-MASA)

Los espectros de masa fueron realizados en un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas, Shimadzu GC-MS QP 5050, con una fuente de ionización de impacto electrónico (EI) de 70 eV, analizador cuadrupolar, con una columna capilar DB-5 MS de 30 m de largo x 0,12 mm de diámetro interior, con un film de 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor y una fase estacionaria compuesta por 5% de fenil y 95% de metilpolisiloxano.

#### 2.5.1.4 Potenciometría

La determinación de halogenuros se realizó por potenciometría, con un electrodo de Ag/Ag<sup>+</sup>, midiendo voltajes con un pHmetro modelo 'Orion' 420 A.

#### 2.5.2 Reactivos

Como solvente de reacción se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) secado con tamices moleculares de 4Å, 1-Cloronaftaleno (Merk, para síntesis) y dimetilformamida (DMF) (Biopack, P.A).

Para las purificaciones por cromatografía en columna se utilizó una columna de vidrio de 40 cm x 2 cm de diámetro y sílica gel (70 - 230 mesh ASTM).

Los solventes orgánicos (pentano, acetato de etilo, acetona, diclorometano) fueron purificados por destilación fraccionada. Se utilizó agua Milli-Q y acetato de etilo en todas las extracciones. Las fases orgánicas fueron secadas con sulfato de sodio anhidro comercial.

Los solventes Tetrahidrofurano (THF) y Hexano que se utilizaron para purificación de compuestos se adquirieron en grado P.A. (Biopack).

Los siguientes reactivos fueron obtenidos comercialmente y utilizados sin tratamiento previo: K<sup>t</sup>-BuO (Sigma-Aldrich, 95%), 2,6-diisopropililanilina (Sigma-Aldrich, 97%), 4-nitroftalonnitrilo (Sigma-Aldrich, 99%), 1-adamantiletanol (Sigma-Aldrich, 98%), 4-tiopiridina (Sigma-Aldrich, 95%), 2-tiopiridina (Sigma-Aldrich, 99%), Ftalonnitrilo (Sigma-Aldrich, 98%), ácido 2,3-piridindicarboxílico (Sigma-Aldrich, 99%), Cloruro de Zinc (Sigma-Aldrich, 98%), 4-aminoftalonnitrilo (Sigma-Aldrich, 98%), Acetato de Zinc dihidrato (Sigma-Aldrich, 98%), 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) (Sigma-Aldrich, 98%), Carbonato de potasio (Sigma-Aldrich, 99.995%), Molibdato de amonio (Sigma-Aldrich, 99,98%), Urea (Sigma-Aldrich, 99%), Tricloruro de Boro 1M en heptano(Sigma-Aldrich).

#### 2.5.3 Modificación de ftalonnitrilos

##### 2.5.3.1 *Modificación de ftalonnitrilos: Reacciones de sustitución nucleofílica radicalaria fotoinducida.*

El 4-iodoftalonnitrilo se sintetizó a partir del 4-aminoftalonnitrilo utilizando la metodología descrita en literatura.<sup>30</sup>

Las reacciones de sustitución nucleofílica radicalaria fotoinducida, se llevaron a cabo en un balón de tres bocas de 50 mL, secado en atmosfera inerte, donde se desgasifican 10 mL de DMSO con agitación y en atmósfera de N<sub>2</sub>. Se agrega la base, el nucleófilo y por el último sustrato. Se coloca el balón en el fotorreactor y se irradia por 3h. Finalizada la reacción, se frena con NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> y agua 20 mL Milli-Q.

Para la síntesis del ftalonitrilo **(5)**, 4-(2,6-diisopropil-1-amino-fenil)ftalonitrilo, se hicieron reaccionar 2,4 mmoles de 2,6-di-isopropil-anilina y 0,8 mmol de 4-iodoftalonitrilo con 2,5 mmoles de base, *tert*-butóxido de potasio K<sup>t</sup>-BuO (Ecuación 1). Finalizada la reacción se realizaron 3 extracciones con 15 mL de diclorometano; se agregó Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para sacar el remanente de agua. Para determinar el porcentaje de deshalogenación del sustrato, la concentración de anión ioduro en la fase acuosa se determinó por potenciometría con un electrodo de plata y una solución de AgNO<sub>3</sub>. Para la purificación del producto se realizó columna cromatográfica de silica gel, utilizando como fase móvil pentano:acetona en una proporción 95:5, determinada previamente por cromatografía en capa fina, TLC por sus siglas en inglés (thin layer chromatography). Peso Molecular (PM) del producto: 303 g/mol. MS (m/z, %): 52 (10), 77 (28), 127 (15), 248 (13), 303 (100), 304 (21). <sup>1</sup>HRMN (CDCl<sub>3</sub>): δ, ppm 8,12 (m, 2H), 8,02 (d, 1H), 7,64 (s, 2H), 3,61 (s, 2H), 2,88 (m, 2H), 1,18 (d, 12H).

### 2.5.3.2 Síntesis de ftalonitrilos: Reacciones de sustitución nucleofílica polar

Las reacciones de sustitución nucleofílica polar, se realizaron en un balón de dos bocas de 50 mL. Se añadió el solvente, 10 mL de DMF, y luego, la base, el nucleófilo y por último el sustrato. La reacción se llevó a cabo calentando a 60°C, y se dejó reaccionar durante toda la noche en atmósfera de N<sub>2</sub>.

En la síntesis de **(6)** 4-(1-adamantiletoksi)ftalonitrilo y **(10)** 4-(piridin-4-tio)ftalonitrilo, se hicieron reaccionar 1 mmol de 4-nitroftalonitrilo, 1,2 mmoles de 1-adamantiletanol o 4-tiopiridina, respectivamente. Se añadieron 1,2 mmoles de base, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Finalizada la reacción, se vierte en agua Milli-Q previamente enfriada y se realizaron 3 extracciones con 15 mL de diclorometano; se agregó Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para sacar el remanente de agua. Para **(6)** 4-(1-adamantiletoksi)ftalonitrilo, la purificación de los productos se realizó por columna cromatográfica de silica gel, utilizando como fase móvil 95:5 pentano:acetona (determinada por TLC). La caracterización del producto se realizó por <sup>1</sup>HRMN, coincidiendo los corrimientos químicos con los reportados anteriormente.<sup>33</sup> PM del producto: 306 g/mol. MS (m/z, %): 53 (10), 55 (20), 67 (33), 77 (28), 79 (61), 81 (46), 91 (32), 93 (59), 107 (46),

121 (14), 135 (100), 163 (82), 207 (12), 306 (21), 307 (4). <sup>1</sup>HRMN (CDCl<sub>3</sub>): δ, ppm 1,48 (t, 2H), 1,52 (s, 6H), 1,68 (s, 6H), 1,98 (s, 3H), 4,10 (t, 2H), 7,17 (dd, 1H), 7,25 (d, 1H), 7,69 (d).

La Purificación de **(10)** 4-(piridin-4-tio)ftalonitrilo se realizó con 3 extracciones básicas de 30mL de acetato de etilo. PM del producto: 237 g/mol. MS (m/z, %): 50 (16), 51 (65), 78 (4), 210 (32), 236 (47), 237 (100), 238 (12). <sup>1</sup>HRMN (CDCl<sub>3</sub>): δ, ppm 8,65 (s, 2H), 7,85 (d, 1H), 7,75 (s, 2H), 7,70 (d, 2H).

En la síntesis de **(12)** 4-(piridin-2-tio)ftalonitrilo, se hicieron reaccionar 0,9 mmol de 4-nitroftalonitrilo, 1,1 mmoles de 2-tiopiridina, con 1,1 mmoles de base, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Ecuación 5). Finalizada la reacción, se vierte en agua Milli-Q previamente enfriada, precipita el producto, y se filtró el sólido. PM del producto: 237 g/mol. MS (m/z, %): 51 (17), 78 (22), 210 (32), 236 (52), 237 (100), 238 (4). <sup>1</sup>HRMN (CDCl<sub>3</sub>): δ, ppm 8,55 (d, 1H), 7,87 (d, 1H), 7,77 (d, 1H), 7,75 (s, 1H), 7,72 (t, 1H), 7,42 (dt, 1H), 7,27 (t, 1H).<sup>21</sup>

#### 2.5.4 Síntesis de subftalocianinas (SubPc)

Para la síntesis de SubPcs, se colocó 1-cloronaftaleno en un tubo de reacción. Se añade el ftalonitrilo correspondiente e inmediatamente antes de poner el tubo en el reactor, se agrega el BCl<sub>3</sub>. Luego de la reacción se obtiene un sólido color violeta que se vierte sobre hexano previamente enfriado para que precipite la SubPc, se hacen lavados con hexano para eliminar el 1-cloronaftaleno. Luego se centrifuga, se elimina el sobrenadante de hexano, y se llevó a bomba de vacío a secar. El equipo usado fue microondas monomode CEM Discovery. Las condiciones de mw que se utilizaron fueron: potencia 100w, temperatura 150°C, tiempo 1,5h y agitación constante. Las cantidades y condiciones de reacción, se muestran en la tabla 2 de la sección Resultados y Discusión.

El producto TriNSubPc **(13)** se utilizó sin posterior purificación.

La síntesis de SubPc (sin sustituyentes) **(15)** se realizó en dos reactores de mw diferentes. El producto de SubPc sintetizado en mw monomode CEM Discovery se purificó con columna de silica gel. La fase móvil utilizada fue 70:20:10 pentano:THF:acetona. Las condiciones de reacción en mw monowave 300 Anton Paar fueron: potencia variable, temperatura 200°C, tiempo 10 min y agitación constante. La purificación se realizó mediante lavados utilizando THF. <sup>1</sup>HRMN (DMSO-d<sub>6</sub>): δ, ppm 8,19 (M, 6H), 7,99 (M, 6H).<sup>34</sup>

## 2.5.5 Síntesis de ftalocianinas

### 2.5.5.1 Síntesis de ftalocianinas simétricas a partir de ftalonitrilos.

La síntesis de ftalocianinas simétricas a partir de ftalonitrilos se realizó por tetramerización asistida con microondas<sup>35</sup> (mw) (Equipo: monomode CEM Discovery). Las condiciones generales de reacción se detallan a continuación. Se colocó el ftalonitrilo en un tubo de reacción para microondas, una barra magnética, Acetato de Zinc (ZnAc) y el solvente, DMF. Por último, inmediatamente antes de colocar el tubo en el reactor, se coloca DBU. Las condiciones de reacción fueron sistema cerrado, 100w, 150°C durante 2h. Al finalizar las reacciones, se obtuvo un sólido de color verde, característico de las Pcs. Se volcó sobre agua Milli-Q previamente enfriada, obteniendo un precipitado verde que se centrifugó y secó en bomba de vacío. En la tabla 2 de la sección Resultados y Discusión, se muestran las cantidades particulares utilizadas en cada reacción.

El método de purificación varía según la Pc sintetizada. ZnPc y TNZnPc se lavaron con acetona y diclorometano respectivamente para eliminar impurezas, en cambio para TPySZnPc se realizó columna cromatográfica utilizando THF:Diclorometano 70:30.

ZnPc (**16**), <sup>1</sup>HNMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ, ppm 9,45 (M, 8H), 8,3 (M, 8H).

TNZnPc (**17**), <sup>1</sup>HNMR (Acetona-d<sub>6</sub>): δ, ppm 8,70(dd, 4H), 8,54 (dd, 4H), 8,12 (dd, 4H).

TPySZnPc (**18**), <sup>1</sup>HNMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ, ppm 8,89 (m, 4H), 8,5 (m, 4H), 8,4 (m, 4H), 8,15 (m, 4H), 7,74 (m, 4H), 7,44 (m, 4H), 7,22 (m, 4H).<sup>36</sup>

### 2.5.5.2 Síntesis de Ftalocianina simétrica partiendo de ácido 2,3-piridindicarboxílico.

Para la síntesis de (**20**) Zinc-2,3-Piridin-Porfirazina (Zn<sub>2</sub>,3PyPz) se utilizó calentamiento convencional.<sup>4,32</sup> Se colocaron 13 mmoles de urea, 0,03 mmoles de molibdato de amonio, y 2,3 mmoles de ácido 2,3 piridindicarboxílico en un balón de dos bocas, con agitación, refrigeración y circulación de N<sub>2</sub>. Luego se agregaron 30 mL de 1-cloronaftaleno, y se calentó a 160°C durante 1 hora, en atmósfera de N<sub>2</sub>. Posteriormente, se agregaron 11,2 mmoles de urea, y 1,95 mmoles de ZnCl<sub>2</sub>, y se calentó a 200°C por 2 horas. Una vez finalizada la reacción, se agregó agua al crudo de reacción y se filtró a presión reducida, obteniendo un sólido de color verde, que se secó en bomba de vacío.

La purificación se realizó precipitando la Pc en agua básica. El precipitado se centrifugó y se llevó a secar con bomba de vacío.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$ , ppm 9,75 (m, 4H), 9,55 (m, 4H), 8,25 (m, 4H).

### 2.5.5.3 Síntesis de ftalocianinas asimétricas $A_3B$

La síntesis de ftalocianinas asimétricas, se realizó asistida por microondas (mw), utilizando monomode CEM Discovery y por calentamiento convencional. En el primer caso, se colocó en un tubo de reacción para microondas, el ftalonitrilo, la SubPc, una barra magnética, ZnAc y el solvente, DMF.<sup>8,9</sup> Por último, antes de colocar el tubo en el reactor, se coloca DBU. Las condiciones de reacción fueron: sistema cerrado, 150w, 150°C durante 2h. Una vez finalizada la reacción, por cualquiera de los dos métodos de calentamiento, se vierte sobre agua Milli-Q previamente enfriada y se obtiene un precipitado color verde que se centrifuga y se lleva a sequedad en bomba de vacío.

La síntesis de MNZnPc (Mono-Nitro-Zincftalocianina) se realizó con calentamiento convencional. En un tubo de reacción se colocó SubPc, 4-nitroftalonitrilo, una barra magnética, ZnAc y el solvente, DMF, DBU a 175°C con agitación por 24h con refrigeración. Al finalizar la reacción, se obtuvo un sólido de color verde, característico de las Pcs. Se volcó sobre agua Milli-Q previamente enfriada, obteniendo un precipitado verde que se centrifugó y secó en bomba de vacío.

Las cantidades utilizadas para cada síntesis se muestran en la tabla 3.

Para purificar MAZnPc (**23**), MTPZnPc (**24**) y MNZnPc (**25**) se realizó cromatografía en columna con silica gel. Las fases móviles se determinaron por TLC. En los tres casos se logró una buena separación con una mezcla de Pentano:Acetona:THF (70:10:20, respectivamente).

MAZnPc (**23**),  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$ , ppm 8,3 (dd, 7H), 7,7 (dd, 7H), 7,25 (m, 1H), 5,8 (d, 2H).

MTPZnPc (**24**),  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$ , ppm 9,23 (m, 2H), 9,17 (m, 2H), 9,05 (m, 2H), 8,57 (m, 2H), 8,2 (m, 5H), 7,8 (m, 2H), 7,4 (m, 2H), 7,27 (m, 2H).

MNZnPc (**25**),  $^1\text{H NMR}$  (Acetona- $\text{d}_6$ ):  $\delta$ , ppm 8,5 (m, 1H), 8,2 (m, 7H), 7,9 (m, 7H).



Tabla 3. Síntesis de ftalocianinas

Pc	Ftalonitrilo mmol		SubPc mmol		ZnAc mmol	DBU mmol	DMF mL
MAZnPc	<b>1</b>	0,10	<b>15</b>	0,1	0,12	1,33	3
MNZnPc	<b>6</b>	0,10	<b>15</b>	0,1	0,12	1,33	3
MTPZnPc	<b>12</b>	0,35	<b>15</b>	0,35	0,4	2,00	3
MDIATriNZnPc	<b>5</b>	0,09	<b>13</b>	0,09	0,095	0,33	4
MAdTriNZnPc	<b>8</b>	0,09	<b>13</b>	0,09	0,095	0,33	3

#### 2.5.5.4 Modificaciones en los grupos periféricos

Para la reducción del grupo  $\text{NO}_2$ , y obtención de **(26)** Tetra-Amino-Zincftalocianina (TAZnPc) se colocó en un balón se colocaron 0,15 mmoles de TNZnPc con  $\text{NaS}_2$  en exceso (2 mmoles). Se calentó a  $60^\circ\text{C}$  durante 1,5h con agitación.<sup>31</sup> Una vez finalizada y enfriada la reacción, el producto se volcó sobre agua Milli-Q previamente enfriada generando la precipitación de la ftalocianina. Se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y se llevó a bomba de vacío a secar el sólido.  $^1\text{HNMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$ , ppm 8,9 (m, 4H), 8,4 (d, 4H), 7,3(d, 4H), 6,2 (s, 8H).

Tetra-Metilamino-Zincftalocianina (TMAZnPc) **(27)**, se obtuvo por metilación del grupo amino. En un balón de dos bocas, con agitación y refrigeración, se colocaron 0,06 mmoles de TAZnPc en 6 mL de sulfato de dimetilo a  $115^\circ\text{C}$  por 24h. Densidad de sulfato de dimetilo 1,33g/mL. Finalizada la reacción se realizaron lavados con éter etílico para eliminar el exceso de sulfato de dimetilo.  $^1\text{HNMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$ , ppm 9,0 (m, 4H), 8,5 (d, 4H), 7,4(d, 4H), 2,6 (t, 36H).

Para la síntesis de **(28)** Zinc-Tetrametil-2,3-Piridin-Porfirazina ( $\text{ZnTM}_{2,3}\text{PyPz}$ ), se colocaron 0,17mmoles de  $\text{Zn}_{2,3}\text{PyPz}$  en un balón de una boca, 5 mL de sulfato de dimetilo, y se dejó reaccionar por 24 h. Se obtuvo finalmente un precipitado de color verde azulado, que se lavó con éter etílico y se llevó al desecador.

$^1\text{HNMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$ , ppm 9,8 (m, 4H), 8,85 (dd, 4H), 8,0(m, 4H), 6,15 (d, 12H).

## 2.6 Bibliografía

1. Li, X.; Zheng, B.-D.; Peng, X.-H.; Li, S.-Z.; Ying, J.-W.; Zhao, Y.; Huang, J.-D.; Yoon, J., Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: Developments in the last five years. *Coordination Chemistry Reviews* **2019**, *379*, 147-160.
2. Sharman, W. M.; Van Lier, J. E., 97 - Synthesis of Phthalocyanine Precursors. In *The Porphyrin Handbook*, Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R., Eds. Academic Press: Amsterdam, **2003**; pp 1-60.
3. de Freitas, L. F.; Hamblin, M. R., Antimicrobial photoinactivation with functionalized fullerenes. In *Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy*, Elsevier: **2016**; pp 1-27.
4. Seotsanyana-Mokhosi, I.; Kuznetsova, N.; Nyokong, T., Photochemical studies of tetra-2,3-pyridinoporphyrazines. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2001**, *140* (3), 215-222.
5. Claessens, C. G.; González-Rodríguez, D.; Torres, T., Subphthalocyanines: Singular Nonplanar Aromatic Compounds Synthesis, Reactivity, and Physical Properties. *Chemical reviews* **2002**, *102* (3), 835-854.
6. Maya, E. M.; García, C.; García-Frutos, E. M.; Vázquez, P.; Torres, T., Synthesis of Novel Push-Pull Unsymmetrically Substituted Alkynyl Phthalocyanines. *The Journal of organic chemistry* **2000**, *65* (9), 2733-2739.
7. Kobayashi, N.; Kondo, R.; Nakajima, S.; Osa, T., New route to unsymmetrical phthalocyanine analogs by the use of structurally distorted subphthalocyanines. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112* (26), 9640-9641.
8. Claessens, C. G.; Gonzalez-Rodriguez, D.; Rodriguez-Morgade, M. S.; Medina, A.; Torres, T., Subphthalocyanines, subporphyrazines, and subporphyrins: singular nonplanar aromatic systems. *Chemical reviews* **2014**, *114* (4), 2192-2277.
9. Wang, A.; Long, L.; Zhang, C., Synthesis of unsymmetrical phthalocyanines: a brief overview. *Tetrahedron* **2012**, *68* (11), 2433-2451.
10. Tempesti, T. C.; Alvarez, M. G.; Durantini, E. N., Synthesis and photodynamic properties of amphiphilic A3B-phthalocyanine derivatives bearing N-heterocycles as potential cationic phototherapeutic agents. *Dyes and Pigments* **2011**, *91* (1), 6-12.
11. Meller, A.; Ossko, A., Phthalocyaninartige Bor-Komplexe. *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly* **1972**, *103* (1), 150-155.
12. Spesia, M.; Durantini, E., *Synthesis of a tricationic subphthalocyanine with potential use in photoinactivation of bacteria*. 2006; p 1393.
13. Claessens, Christian G.; González-Rodríguez, D.; del Rey, B.; Torres, T.; Mark, G.; Schuchmann, H.-P.; von Sonntag, C.; MacDonald, J. G.; Nohr, Ronald S., Highly Efficient Synthesis of Chloro- and Phenoxy-Substituted Subphthalocyanines. *European Journal of Organic Chemistry* **2003**, *2003* (14), 2547-2551.
14. Giribabu, L.; Vijay Kumar, C.; Surendar, A.; Gopal Reddy, V.; Chandrasekharam, M.; Yella Reddy, P., Highly Efficient Microwave-Assisted Synthesis of Subphthalocyanines. *Synthetic Communications* **2007**, *37* (23), 4141-4147.

15. Villemain, D.; Hammadi, M.; Hachemi, M.; Bar, N., Applications of Microwave in Organic Synthesis: An Improved One-step Synthesis of Metallophthalocyanines and a New Modified Microwave Oven for Dry Reactions. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry* **2001**, 6 (10), 831-844.
16. Lidström, P.; Tierney, J.; Wathey, B.; Westman, J., Microwave assisted organic synthesis—a review. *Tetrahedron* **2001**, 57 (45), 9225-9283.
17. Kantekin, H.; Biyıklıoğlu, Z., Synthesis and characterization of new polymeric phthalocyanines substituted with pyridine through methyleneoxy bridges by microwave irradiation. *Dyes and Pigments* **2008**, 77 (2), 432-436.
18. Kantar, C.; Açar, E.; Şaşmaz, S., The microwave-assisted synthesis and characterization of novel polymeric phthalocyanines containing resorcinarene. *Dyes and Pigments* **2008**, 77 (3), 487-492.
19. Güzel, E.; Koca, A.; Gül, A.; Koçak, M. B., Microwave-assisted synthesis, electrochemistry and spectroelectrochemistry of amphiphilic phthalocyanines. *Synthetic Metals* **2015**, 199, 372-380.
20. Wöhrle, D.; Schnurpfeil, G.; Knothe, G., Efficient synthesis of phthalocyanines and related macrocyclic compounds in the presence of organic bases. *Dyes and Pigments* **1992**, 18 (2), 91-102.
21. Sehlotho, N.; Durmuş, M.; Ahsen, V.; Nyokong, T., The synthesis and electrochemical behaviour of water soluble manganese phthalocyanines: Anion radical versus Mn(I) species. *Inorganic Chemistry Communications* **2008**, 11 (5), 479-483.
22. Masilela, N.; Kleyi, P.; Tshentu, Z.; Priniotakis, G.; Westbroek, P.; Nyokong, T., Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* using low symmetrically substituted phthalocyanines supported on a polystyrene polymer fiber. *Dyes and Pigments* **2013**, 96 (2), 500-508.
23. Çakır, V.; Göksel, M.; Durmuş, M.; Biyıklıoğlu, Z., Synthesis and photophysical properties of novel water soluble phthalocyanines. *Dyes and Pigments* **2016**, 125, 414-425.
24. Dumoulin, F.; Durmuş, M.; Ahsen, V.; Nyokong, T., Synthetic pathways to water-soluble phthalocyanines and close analogs. *Coordination Chemistry Reviews* **2010**, 254 (23), 2792-2847.
25. Chidawanyika, W.; Nyokong, T., The synthesis and photophysical properties of low-symmetry zinc phthalocyanine analogues. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2009**, 206 (2), 169-176.
26. Li, J.; Vigh, S.; McArthur, C.; Terekhov, D.; Leznoff, C., Multisubstituted Phthalonitriles, Naphthalenedicarbonitriles, and Phenanthrenetetracarbonitriles as Precursors for Phthalocyanine Syntheses. *Canadian Journal of Chemistry* **2011**, 73.
27. Marcuccio, S. M.; Svirskaya, P. I.; Greenberg, S.; Lever, A. B. P.; Leznoff, C. C.; Tomer, K. B., Binuclear phthalocyanines covalently linked through two- and four-atom bridges. *Canadian Journal of Chemistry* **1985**, 63 (11), 3057-3069.
28. Tempesti, T. C.; Baumgartner, M. T., Synthesis of phthalonitrile derivatives by photoinduced reactions. New unsymmetrical substituted zinc phthalocyanines. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2015**, 19 (10), 1088-1094.
29. Rossi, R.; Peñéñory, A., Strategies in Synthetic Radical Organic Chemistry. Recent Advances on Cyclization and SRN1 Reactions. *Current Organic Synthesis* **2006**, 3, 121-158.

30. Leznoff, C. C.; Terekhov, D. S.; McArthur, C. R.; Vigh, S.; Li, J., Multisubstituted phthalonitriles, naphthalenedicarbonitriles, and phenanthrenetetracarbonitriles as precursors for phthalocyanine syntheses. *Canadian Journal of Chemistry* **1995**, *73* (3), 435-443.
31. Cong, F.-D.; Ning, B.; Du, X.-G.; Ma, C.-Y.; Yu, H.-F.; Chen, B., Facile synthesis, characterization and property comparisons of tetraaminometallophthalocyanines with and without intramolecular hydrogen bonds. *Dyes and Pigments* **2005**, *66* (2), 149-154.
32. Wöhrle, D.; Gitzel, J.; Okura, I.; Aono, S., Photoredox properties of tetra-2,3-pyridinoporphyrazines (29H,31H-tetrapyrido[2,3-b:2',3'-g:2'',3''-l:2''',3'''-q]porphyrazine). *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **1985**, (8), 1171-1178.
33. Ochoa, A. L.; Tempesti, T. C.; Spesia, M. B.; Milanesio, M. E.; Durantini, E. N., Synthesis and photodynamic properties of adamantylethoxy Zn(II) phthalocyanine derivatives in different media and in human red blood cells. *European journal of medicinal chemistry* **2012**, *50*, 280-287.
34. Diaz-Garcia, M. A.; Agullo-Lopez, F.; Sastre, A.; Torres, T.; Torruellas, W. E.; Stegeman, G. I., Third Harmonic Generation Spectroscopy of Boron Subphthalocyanine. *The Journal of Physical Chemistry* **1995**, *99* (41), 14988-14991.
35. Gerdes, R.; Lapok, L.; Tsaryova, O.; Wöhrle, D.; Gorun, S. M., Rational design of a reactive yet stable organic-based photocatalyst. *Dalton transactions* **2009**, (7), 1098-1100.
36. Saydan, N.; Durmuş, M.; Dizge, M. G.; Yaman, H.; Gürek, A. G.; Antunes, E.; Nyokong, T.; Ahsen, V., Water-soluble phthalocyanines mediated photodynamic effect on mesothelioma cells. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2009**, *13* (06), 681-690.

---

## Capítulo 3

---

# Ftalocianinas: caracterización por espectroscopía de absorción y de fluorescencia

3.1	Introducción .....	65
3.2	Objetivos .....	69
3.3	Resultados y discusión.....	70
3.3.1	Caracterización espectroscópica por UV-vis .....	70
3.3.2	Espectroscopía de emisión de fluorescencia.....	74
3.3.3	Rendimiento cuántico de oxígeno singlete .....	75
3.4	Conclusiones.....	77
3.5	Sección experimental .....	78
3.5.1	Equipamiento .....	78
3.5.2	Espectroscopía de absorción.....	78
3.5.3	Espectroscopía de emisión de fluorescencia.....	78
3.5.4	Determinación del rendimiento cuántico de oxígeno singlete.....	79
3.6	Bibliografía.....	80



### 3.1 Introducción

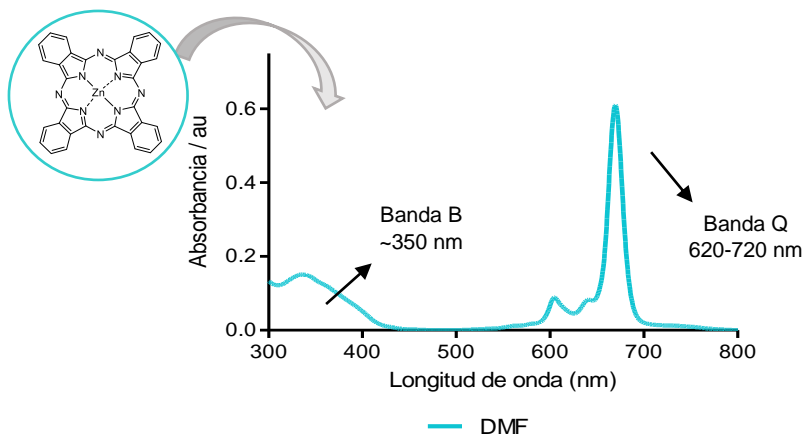
Las ftalocianinas (Pcs) son heterociclos aromáticos que consisten en cuatro anillos de isoindol unidos por átomos de nitrógeno.<sup>1</sup> El intenso color azul verdoso de las ftalocianinas se debe a la deslocalización electrónica de sus 18 electrones  $\pi$ . Esto hizo que inicialmente fueran usadas en la industria como colorantes y pigmentos en varios campos.<sup>2</sup> En la Figura 1 se muestra foto de una solución en *N,N*-dimetilformamida (DMF) de dos Pcs sintetizadas, como se describe en el capítulo anterior, TAZnPc (**26**) (izquierda) y ZnPc (**16**) (derecha).



Figura 1. Foto de solución de TAZnPc (**26**) (izquierda) y ZnPc (**16**) (derecha) en DMF.

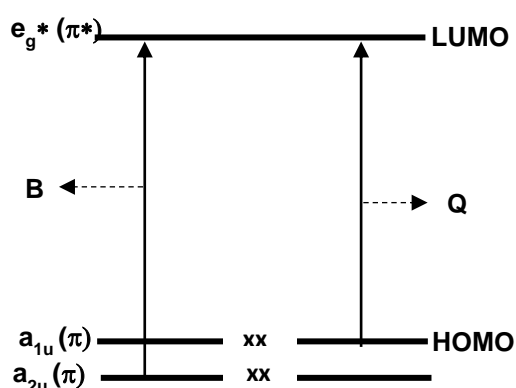
Los espectros UV-vis de las Pcs muestran dos bandas. La banda principal posee una absorción en el visible cercano al infrarrojo, denominada banda Q, es estrecha e intensa y se encuentra en la región de 600–720 nm; y otra en el ultravioleta cercano, denominada banda B o Soret, más ancha y menos intensa y se encuentra aproximadamente a 350 nm (ver Esquema 1). La Banda Q posee altos coeficientes de extinción molar, los cuales están en el orden de  $10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .<sup>1,3</sup> Tanto la banda Q como la B surgen de las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$ .<sup>4,5</sup>

Esquema 1. Espectro de absorción de ZnPc en DMF. Se indican las dos bandas de absorción características.



El modelo de los cuatro orbitales moleculares de Gouterman explica el origen del espectro UV-vis de las Pcs coordinadas con metales (Esquema 2).<sup>6</sup> Según la teoría, los orbitales moleculares doblemente ocupados de mayor energía son  $a_{1u}(\pi)$  y  $a_{2u}(\pi)$  HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital,  $\pi$ ) del anillo y el orbital desocupado más bajo es el  $e_g(\pi)$  LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital,  $\pi^*$ ). Las bandas Q y B surgen de las transiciones desde  $a_{1u}(\pi)$  y  $a_{2u}(\pi)$  al orbital  $e_g(\pi)$  respectivamente.<sup>7,8</sup> La banda Q absorbe a mayores longitudes de onda ya que la energía necesaria para la transición entre  $a_{1u} \rightarrow e_g$  es menor que en  $a_{2u} \rightarrow e_g$  (Esquema 1).

Esquema 2. Diagrama energético de las transiciones electrónicas en las Pcs



La posición y el ancho de las bandas de absorción pueden modificarse cambiando el tamaño y la simetría del sistema conjugado de las Pcs.<sup>9,10</sup> En general, las Pcs pueden modificarse de diferentes maneras como puede observarse en la Figura 2.<sup>11,12</sup> Se puede variar: el átomo metálico central con o sin ligandos axiales,<sup>13,14</sup> los sustituyentes en posición meso,<sup>15,16</sup> como así también el tipo y número de sustituyentes periféricos.<sup>13,17,18,19</sup> El solvente y la agregación también afectan las bandas de absorción.<sup>11,20</sup>

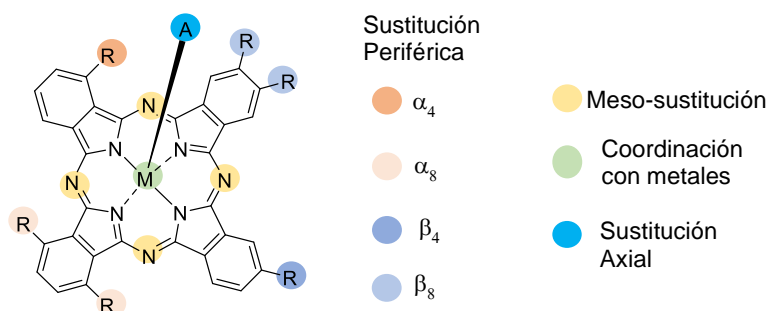


Figura 2. Posición y número de sustituyentes en las Pcs



La agregación en las Pcs puede describirse como la asociación de moléculas que conducen a dímeros, oligómeros o mezclas de ambos. El grado de agregación depende de la interacción  $\pi$ - $\pi$ , fuerzas de Van der Waals y enlaces de hidrógeno entre moléculas de Pcs y/o con solventes. La efectividad de estas interacciones depende de factores tales como la proximidad del anillo, la posición de superposición, el ángulo de inclinación que adopta el anillo Pc y el volumen de los grupos periféricos. La alta concentración de Pcs fomenta la agregación, ya que genera cercanía entre moléculas. Las sustituciones axiales, en los centros metálicos de las Pcs, disminuyen la agregación, como así también lo hacen las sustituciones periféricas con grupos voluminosos.<sup>17</sup> Cuanto más voluminosos son los grupos periféricos, menor es la agregación, ya que los grupos más voluminosos reducen la cercanía de los anillos. Además, las Pcs simétricas tienden a presentar más agregación que las asimétricas, esto puede atribuirse a la superposición más efectiva de los anillos en Pcs simétricas. La naturaleza de los solventes también juega un papel en la formación de agregados, que tiende a ser más pronunciada en solventes polares que en solventes no polares. El efecto de la agregación en los espectros de absorción de Pcs se puede observar por el cambio en la forma, la división y ensanchamiento de la banda Q. La presencia de un hombro en la banda Q, entre los 630-646 nm se atribuye a las especies agregadas.<sup>11,20</sup>

La agregación en los PSs es de relevancia, ya que afecta a las propiedades fotofísicas, a la emisión como a la absorción, disminuyendo sustancialmente el rendimiento cuántico de fluorescencia y de oxígeno singlete ya que los agregados no están excitados o bien liberan energía de los estados excitados de una manera diferente.<sup>4</sup>

Las Pcs se utilizan principalmente en terapia fotodinámica (TFD), por lo cual es muy importante la longitud de onda de absorción de la banda Q, teniendo en cuenta que el rango de absorción de luz de la ventana fototerapéutica es de 650 a 850 nm.<sup>1,21</sup> Además, incluso se ha reportado que la profundidad de penetración de la luz a 670 nm ( $\lambda$  de activación de ZnPc) es aproximadamente el doble que a 630 nm ( $\lambda$  de activación de Photofrin<sup>®</sup>, porfirina comercial), y se vuelve aún mayor a longitudes de onda más largas.<sup>22</sup>

Teniendo en cuenta que los efectos de los sustituyentes en la banda B se consideran menos significativos que aquellos de la banda Q,<sup>11,23</sup> la mayor parte de los estudios son realizados sobre la banda Q.<sup>23,24,25</sup> Además, por la absorción a longitudes de onda bajas, la banda Q no es de importancia en TFD.

Cuando un fotosensibilizador (PS) absorbe energía, pasa del estado basal (PS<sup>0</sup>) a un estado excitado (PS<sup>\*</sup>). Para volver al estado basal puede hacerlo mediante diferentes vías, una de ellas, es la emisión de fluorescencia (Ver Diagrama de Jablonski en Capítulo 1 “Introducción general”, Figura 1, sección 1.1.2). En la mayoría de los casos, la luz emitida tiene una longitud de onda más larga que la luz absorbida.<sup>26</sup> El espectro de emisión es la imagen especular del espectro de absorción, poniendo de manifiesto que las conformaciones de los estados PS<sup>0</sup> y PS<sup>\*</sup> son muy similares (ver Figura 3).

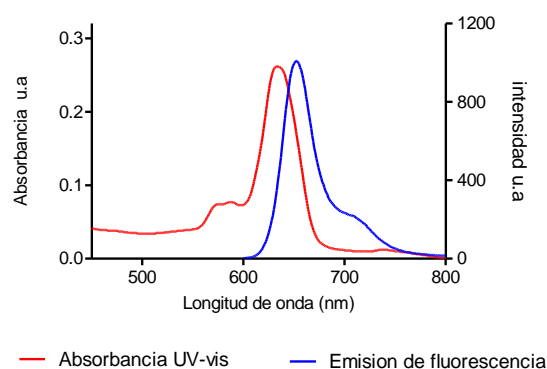


Figura 3. Espectro de absorción y emisión de una Zn-ftalocianina

El diseño de PSs eficientes requiere que sea favorecida la formación del estado triplete <sup>3</sup>PS\* por entrecruzamiento de sistemas, ya que es el intermediario en las reacciones fotoquímicas tipo I y II que luego generan las especies reactivas.<sup>27</sup> Sin embargo, esto implicaría un bajo rendimiento cuántico de fluorescencia, dificultando la cuantificación y detección del agente fotosensibilizador, es decir, la posibilidad de orientar la utilidad de estos compuestos hacia una funcionalidad dual, utilizándolos como fluoróforos para técnicas de imagen y señalización celular, y también, como fotosensibilizadores (PSs) en la inactivación fotodinámica.<sup>27</sup> Las Pcs se caracterizan por presentar buenos rendimientos cuánticos de fluorescencia y una emisión con una banda estrecha ( $\Delta \lambda_{1/2}=15$  nm) a altas longitudes de onda (entre 670 y 750 nm). El tiempo de vida de fluorescencia para las ftalocianinas oscila entre 1 y 7 ns.<sup>28</sup>

Así mismo, un tiempo de vida mayor del estado triplete excitado del PS es un requisito para obtener una fotosensibilización eficiente. Los factores que afectan el tiempo de vida del estado de triplete excitado son la selección del ion metálico y la agregación. Las ftalocianinas que contienen metales paramagnéticos (ej, Cu, Co, Ni, Fe, Pd) tienen tiempos de vida del estado triplete cortos, disminuyendo la fotoactividad. En cambio, Pcs con metales diamagnéticos como Al, Zn y Si, presentan tiempos de vida mayores.<sup>20,29</sup>

Irradiar un PS en un medio oxigenado, puede generar un proceso fotoquímico de tipo II, en donde hay una transferencia de energía entre el estado de triplete excitado del PS ( $^3\text{PS}^*$ ) y el oxígeno molecular ( $^3\text{O}_2$ ) para generar oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) que constituye una molécula altamente reactiva, considerada un agente citotóxico.<sup>26,30</sup> Es por ello que se buscan PSs con buen rendimiento cuántico de oxígeno singlete ( $\Phi_\Delta$ ) ya que puede proporcionar información valiosa sobre el potencial de un compuesto para convertirse en un buen fotosensibilizador para TFD.

### 3.2 Objetivos

La caracterización de los fotosensibilizadores por espectroscopía de absorción y de emisión proporciona información de relevancia, y tiene particular interés si se desean utilizar en TFD. Es por ello que el objetivo de este capítulo es “Estudiar los efectos de los diferentes sustituyentes sobre las bandas de absorción y de emisión, como así también el rendimiento cuántico de oxígeno singlete de las ftalocianinas sintetizadas”.

Para alcanzar este objetivo, se propusieron como objetivos específicos:

- Evaluar los fotosensibilizadores sintetizados previamente, a través de espectrofotometría de absorción y fluorescencia.
- Realizar comparaciones entre el número y el tipo de sustituyente presente en cada molécula y las características espectroscópicas.
- Determinar el rendimiento cuántico de oxígeno singlete de las Pcs.

### 3.3 Resultados y discusión

En la Figura 4, se muestra la estructura química correspondiente a las Pcs y SubPcs estudiadas en este capítulo.

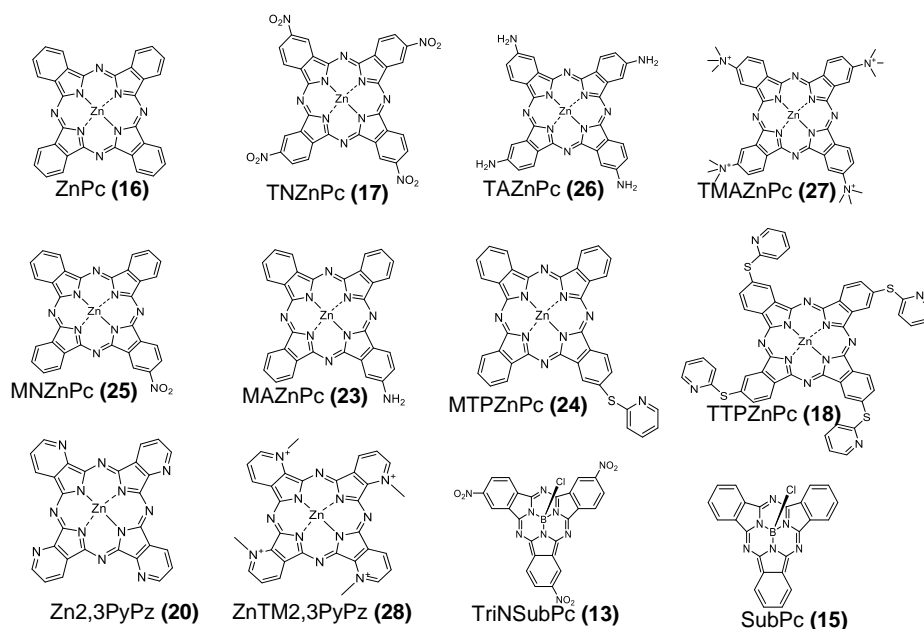


Figura 4. Estructura de las Pcs y SubPcs.

#### 3.3.1 Caracterización espectroscópica por UV-vis

Los espectros de absorción de las dos SubPcs sintetizadas, SubPc sin sustituyentes y TriNSubPc que posee sustituyentes nitro en posición 4 se muestran en la Figura 5a. Los espectros muestran un corrimiento batocrómico de la TriNSubPc respecto a SubPc debido a la presencia de los tres sustituyentes nitro en la molécula. Estos espectros coinciden con los previamente reportados en literatura.<sup>31,32</sup>

Los espectros de absorción UV-vis de las SubPc son comparables a los de las Pcs ya que ambas muestran una banda Q de absorción intensa. Las SubPcs están formadas por tres unidades de iminoisoindolina, mientras que las Pcs por cuatro, por lo tanto, es de esperar que los espectros muestren diferentes longitudes de onda en los máximos de absorción de la banda Q. En la Figura 5 se muestran los espectros comparativos de las SubPcs con la respectiva Pc. En la Figura 5b SubPc y ZnPc (ninguna posee sustituyente) y en la Figura 5c TriNSubPc y TNZnPc (ambas poseen sustituyentes nitro).

En la Figura 5b y 5c puede observarse que, la banda Q de las Pcs están desplazadas hacia mayores  $\lambda$  con relación a ambas SubPcs. Estos corrimientos de las SubPcs hacia menores longitudes de onda de absorción respecto a las Pcs son consecuencia de una disminución en el sistema de conjugación  $\pi$ , de 18 electrones  $\pi$  para las Pcs a 14 electrones  $\pi$  en SubPcs.

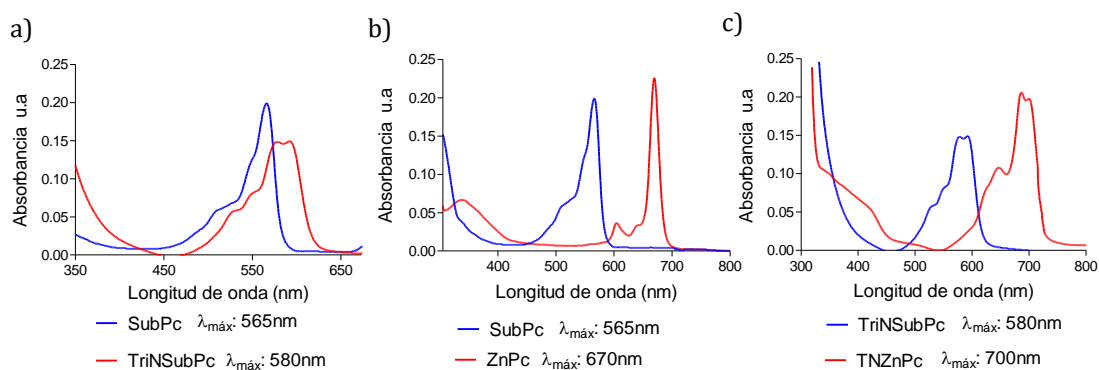


Figura 5. Espectros de absorción en DMF de a) SubPc y TriNSubPc, b) SubPc y ZnPc; y c) TriNSubPc y TNZnPc

Como se mencionó previamente, los PSs deben presentar una fuerte absorción a altas longitudes de onda para su aplicabilidad en TFD, la posición de la banda Q difiere de acuerdo al tipo de macrociclo y se ve afectada por los átomos centrales, y la sustitución periférica,<sup>17</sup> por lo tanto los análisis fotofísicos se harán en torno a la banda Q.

Los espectros de absorción de las diferentes ftalocianinas se comparan con el correspondiente de ZnPc como referencia debido a que no posee sustituyentes. A fin de comparar el efecto del número de sustituyentes, en la Figura 6 se muestran los espectros de las Pcs mono y tetra sustituidas. En la Figura 6a se muestran los espectros de las ftalocianinas asimétricas del tipo  $A_3B$  MNZnPc, MAZnPc y MTPZnPc en donde A es hidrógeno y B es un ftalonitrilo sustituido en posición 4 con grupo nitro, amino o tiopiridina respectivamente. En la Figura 6b se muestran los espectros de las Pc simétricas, del tipo  $A_4$ , de ZnPc y tres sustituidas con grupos nitro, amino y tiopiridina, TNZnPc, TAZnPc y TTPZnPc respectivamente.

En la figura 6a pueden observarse los espectros de las Pcs monosustituidas, los sustituyentes no generan ningún tipo de desplazamiento en las bandas de absorción respecto ZnPc, esto se debe a que 3 de las 4 unidades de isoindol son iguales a las de ZnPc. En cambio, cuando los sustituyentes están presentes en los 4 grupos isoindol como es el caso de las tetrasustituidas, el efecto de los sustituyentes se ve reflejado en el espectro de absorción, Figura 6b. Se conoce que los sustituyentes tiol pueden causar corrimientos de la

banda Q hacia el rojo.<sup>33</sup> La banda de absorción de TTPZnPc (línea azul) no difiere en la forma correspondiente a ZnPc, pero si en la  $\lambda_{\text{máx}}$  de absorción, observándose un corrimiento batocrómico de 670 a 683 nm. La banda Q de TNZnPc y TAZnPc (línea roja y verde respectivamente) muestran un desplazamiento hacia mayores longitudes de onda respecto a ZnPc. Además, la forma de la banda de absorción muestra agregación, ya que no están bien definidas, ensanchándose en la base. Si bien el solvente en el que se determinan los espectros es DMF y la tendencia a agregación debería disminuir, algunas Pcs, continúan agregadas en solventes no acuosos.<sup>24</sup>

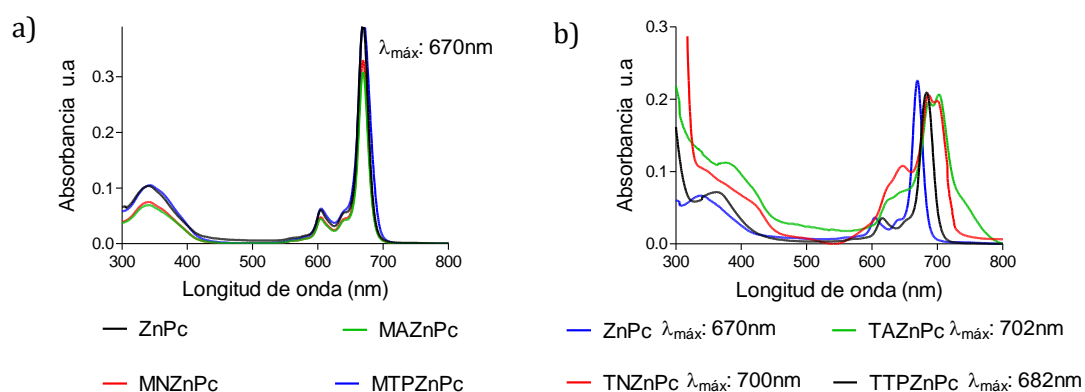


Figura 6. Espectros de absorción en DMF de a) Pcs asimétricas A<sub>3</sub>B y b) Pcs simétricas

En el capítulo 2 “Síntesis y caracterización de ftalocianinas” se informó que TAZnPC y TMZnPc se obtuvieron a partir de sucesivas modificaciones en la periferia de TNZnPc. En la Figura 7, se muestran los espectros de absorción de TNZnPc, TAZnPc, TMZnPc y ZnPc a fin de comparar los efectos de los distintos sustituyentes periféricos en sus propiedades espectroscópicas.

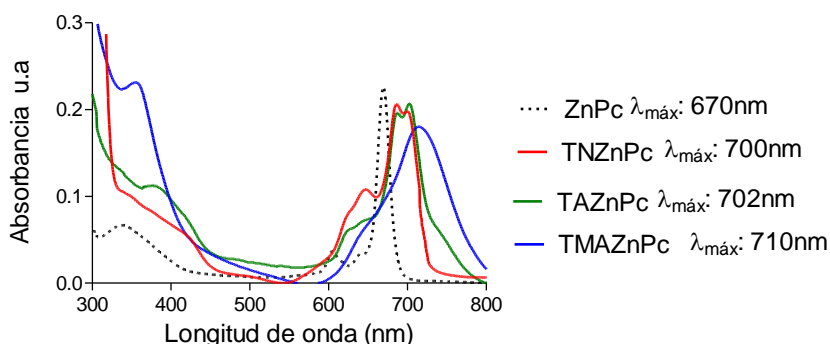


Figura 7. Efectos en  $\lambda_{\text{máx}}$  de absorción de las modificaciones periféricas del grupo nitro

Como se explicó anteriormente, y como puede observarse en la Figura 7, la presencia de 4 grupos nitro (TNZnPc) y amino (TAZnPc) en la periferia, modifican la forma y la  $\lambda$  de absorción de manera similar respecto a ZnPc; es decir, que la reducción de los grupos nitro

no generan grandes cambios en la absorción UV-vis. Al tri-metilar los grupos aminos periféricos de TAZnPc para obtener TMAZnPc (línea azul), se genera un ensanchamiento de banda y un desplazamiento batocrómico aún mayor.

En la Figura 8 se muestran los espectros de absorción de las Pc con N en el anillo (porfirazinas) Zn<sub>2</sub>,3PyPz (línea roja) y ZnTM<sub>2</sub>,3PyPz (línea verde), y de ZnPc (línea de puntos).

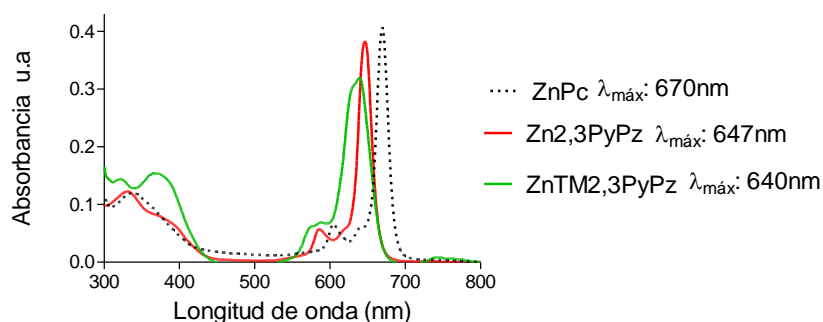


Figura 8. Espectros de absorción de ZnPc (DMF) y Zn<sub>2</sub>,3PyPz (DMSO) y ZnTM<sub>2</sub>,3PyPz (agua)

La banda Q de Zn<sub>2</sub>,3PyPz se desplaza hacia menores longitudes de onda en comparación con el análogo de carbono respectivo (ZnPc) ya que un carbono aromático de la molécula está sustituido por un nitrógeno.<sup>12</sup> La metilación en el nitrógeno (ZnTM<sub>2</sub>,3PyPz) genera un desplazamiento hacia el azul de ~2nm más que Zn<sub>2</sub>,3PyPz.

En la tabla 1 se muestra un resumen de las longitudes de onda de absorción de la banda Q, de las SubPcs y de las Pcs estudiadas en este capítulo.

Tabla 1. Resumen de las longitudes de onda absorción de las SubPc y Pcs.

Sub ftalocianina	Solvente	$\lambda_{\max}$ absorción (nm)
SubPc	DMF	565
TriNSubPc	DMF	580
Ftalocianina		$\lambda_{\max}$ absorción (nm)
ZnPc	DMF	670
MAZnPc	DMF	670
MTPZnPc	DMF	670
MNZnPc	DMF	670
TAZnPc	DMF	702
TTPZnPc	DMF	682
TNZnPc	DMF	700
TMAZnPc	DMF	710
Zn <sub>2</sub> ,3PyPz	DMSO	647
ZnTM <sub>2</sub> ,3PyPz	AGUA	640

### 3.3.2 Espectroscopía de emisión de fluorescencia

La importancia de la emisión de fluorescencia de las Pcs, radica en la posibilidad de localizar el fotosensibilizador dentro de los compartimentos celulares<sup>34,35</sup> o para hacer determinaciones de la cantidad de PS incorporado en una célula<sup>17</sup>.

Se determinaron las  $\lambda_{\text{max}}$  de emisión, usando la longitud de onda de excitación ( $\lambda_{\text{exc}}$ ) determinada por el espectro de absorción de cada Pc. En la Figura 9 se muestran espectros de emisión de 3 Pcs a modo de ejemplo.

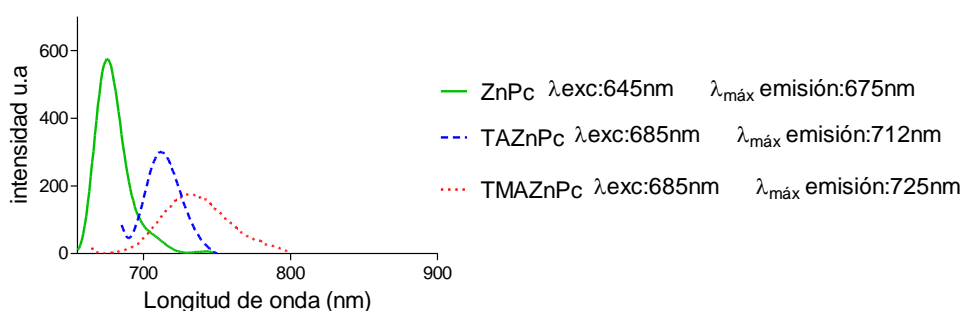


Figura 9. Espectro de emisión de ZnPc, TAZnPc y TMAZnPc en DMF.

En la tabla 2 se muestran los valores de  $\lambda_{\text{max}}$  excitación y  $\lambda_{\text{max}}$  emisión para las Pcs que se midieron en esta sección.

Tabla 2. Longitudes de onda de emisión y excitación.

Ftalocianina	Solvente	$\lambda$ Excitación (nm)	$\lambda_{\text{max}}$ Emisión (nm)
ZnPc	DMF	645	675
MAZnPc	DMF	645	675
MTPZnPc	DMF	645	677
MNZnPc	DMF	645	675
TAZnPc	DMF	685	712
TTPZnPc	DMF	655	693
TNZnPc	DMF	680	710
TMAZnPc	DMF	685	725
Zn2,3PyPz	DMSO	635	655
ZnTM2,3PyPz	AGUA	630	651

Las  $\lambda_{\text{max}}$  de emisión se ven afectadas por los distintos sustituyentes de las Pc. Respecto a ZnPc, las  $\lambda_{\text{max}}$  de emisión en las Pcs asimétricas ( $A_3B$ ) se mantienen iguales, mientras que en las Pcs simétricas sustituidas ( $A_4$ ) se observa incremento en las  $\lambda_{\text{max}}$ . Las Pcs con N en el ciclo (porfirazinas) muestran un desplazamiento de su  $\lambda_{\text{max}}$  hacia menores



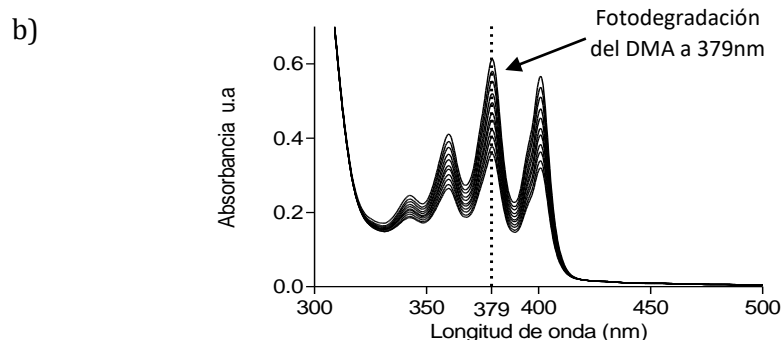
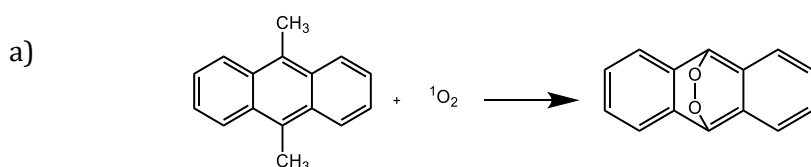
longitudes de onda. El efecto encontrado de los diferentes sustituyentes de las Pcs en espectroscopía de fluorescencia fue similar al observado en la espectroscopía de absorción.

### 3.3.3 Rendimiento cuántico de oxígeno singlete

La determinación del rendimiento cuántico de oxígeno singlete ( $^1O_2$ ),  $\Phi_{\Delta}$ , permite estimar potenciales efectos de las Pcs en aplicaciones en TFD. La generación de  $^1O_2$  puede cuantificarse por distintos métodos; a través del método directo, se mide la luminiscencia del  $^1O_2$ ; o por el método indirecto, en donde un compuesto desactiva el  $^1O_2$  por una reacción química. Como *quencher*s del  $^1O_2$  en solventes orgánicos pueden usarse 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) o 9,10-dimetilantraceno (DMA), mientras que en medios acuosos puede usarse antraceno-9,10-bis-metilmalonato (ADMA) o L-triptófano. El nivel de *quenching* está directamente relacionado con la cantidad de oxígeno singlete producido.<sup>26,30,36,37</sup>

En este trabajo de tesis, el rendimiento cuántico de oxígeno singlete,  $\Phi_{\Delta}$ , se determinó por el método indirecto utilizando DMA. La reacción del DMA con el  $^1O_2$  (Esquema 3a) se analiza mediante espectroscopía UV. El espectro de absorción del DMA muestra tres bandas comprendidas entre 320 a 410 nm. Para las determinaciones de fotodegradación del DMA, se sigue el decaimiento de la banda a 379nm (ver Esquema 3b).

Esquema 3. a) Reacción de fotodegradación del DMA. b) Espectro de absorción de fotodegradación de DMA.



En la Figura 10a puede observarse como disminuye la señal del DMA en el espectro de absorción en el tiempo, mientras se irradia TAZnPc con luz roja ( $\lambda = 625 \text{ nm}$ ). La Figura 10b muestra la ecuación utilizada para realizar el cálculo del  $\Phi_{\Delta}$  y un ejemplo de la gráfica semilogarítmica típica, que describe el progreso de la reacción para DMA utilizando TAZnPC y ZnPc como PS. De esos gráficos, se determinaron los valores de las constantes de velocidad a partir de la pendiente, irradiando el sistema con una lámpara de luz roja.

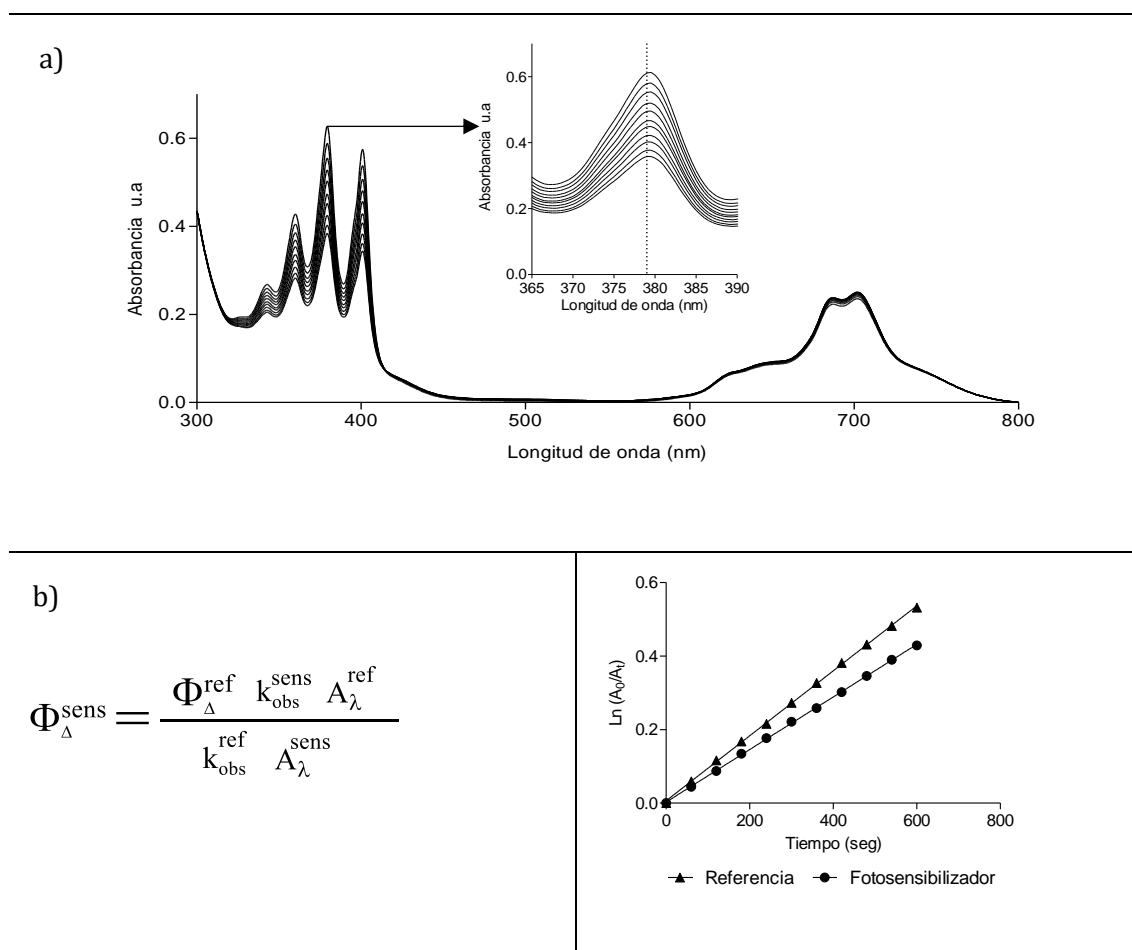


Figura 10. a) Espectro de absorción del experimento completo de fotooxidación de DMA. b) Gráfica semilogarítmica del progreso de la fotooxidación del DMA

El rendimiento cuántico de producción de  $^1\text{O}_2$  fue calculado comparando la pendiente de las Pcs con la correspondiente pendiente obtenida para el compuesto de referencia, ZnPc, en DMF y utilizando la ecuación descrita en la sección experimental. En la Tabla 3 se muestran los rendimientos cuánticos de  $^1\text{O}_2$  determinados.

Tabla 3. Rendimiento cuántico de oxígeno singlete de las Pcs.

Ftalocianina	$k_{\text{obs}}^{\text{DMA}} \cdot 10^{-4}$	$\Phi_{\Delta}$
ZnPc	$8,83 \pm 0,1$	0,56
TNZnPc	$6,37 \pm 0,1$	0,43
TAZnPc	$7,14 \pm 0,1$	0,49
TMAZnPc	$5,38 \pm 0,1$	0,40
MTPZnPc	$6,49 \pm 0,1$	0,46

Como puede observarse, la producción de  $^1\text{O}_2$  obtenida para las moléculas ensayadas, es similar a la referencia ( $\Phi_{\Delta\text{ZnPc}}$ : 0,56)<sup>38</sup>. Es importante tener en cuenta que los valores de  $\Phi_{\Delta}$  pueden cambiar significativamente en diferentes medios y disminuir cuando el sensibilizador está agregado.<sup>30</sup>

El rendimiento cuántico de  $^1\text{O}_2$  para ZnTM2,3PyPz fue determinado previamente en micelas reversas de n-heptano/AOT (0,1M) / agua (W0=30); el valor obtenido fue de 0,65.<sup>39</sup>

### 3.4 Conclusiones

La absorción de los PS en la “ventana fototerapéutica” para ser usados en TFD es muy importante. Las modificaciones en el anillo generan diferentes desplazamientos en las bandas de absorción. La adición de grupos en la periferia dio como resultado un desplazamiento hacia el rojo de las bandas Q de las Pcs simétricas tetrasustituidas ( $A_4$ ), respecto a ZnPc; en cambio en las Pcs monosustituidas ( $A_3B$ ) no se observaron corrimientos respecto a ZnPc. La sustitución de átomos de carbono aromáticos del core de la molécula por nitrógenos (porfirazinas) generó un desplazamiento hipocrómico de las bandas Q. Los espectros de fluorescencia mostraron un comportamiento similar al observado en la espectroscopia de absorción. Teniendo presente que una de las vías por la cual los PSs generan daño celular es a través de oxígeno singlete, las determinaciones del rendimiento cuántico de oxígeno singlete de las Pcs ensayadas arrojaron resultados similares al de ZnPc.

## 3.5 Sección experimental

### 3.5.1 Equipamiento

Los equipos utilizados para determinar los espectros de absorción y de emisión fueron, espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 y espectrofotómetro de fluorescencia Agilent Cary Eclipse, respectivamente. Ambos espectrofotómetros están equipados con sistema termostatzado.

El equipo de iluminación para la determinación del rendimiento cuántico de oxígeno singlete posee luz monocromática ( $\lambda = 625 \text{ nm}$ ), generada por una lámpara LED roja NES110NR.

### 3.5.2 Espectroscopía de absorción

Los espectros fueron realizados a  $25 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$  usando una celda de cuarzo con un paso óptico de 1 cm. El solvente utilizado para determinar los espectros UV-vis fue DMF, excepto para Zn<sub>2</sub>,3PyPz y ZnTM<sub>2</sub>,3PyPz que se utilizó DMSO y agua respectivamente. Las concentraciones utilizadas fueron ajustadas para obtener valores de absorbancias comparables y poder evaluar apropiadamente los efectos de los sustituyentes en los corrimientos batocrómicos o hipsocrómicos de los espectros de absorción de Pcs y SubPcs respecto a ZnPc.

### 3.5.3 Espectroscopía de emisión de fluorescencia

Los espectros de emisión fueron realizados a  $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  usando una celda de fluorescencia, con un paso óptico de 1 cm. Al igual que en UV-vis, los solventes utilizados fueron DMF, DMSO y agua.

En la Tabla 1 de la sección Resultados y Discusión se muestran las  $\lambda_{\text{exc}}$  utilizadas para obtener los espectros de emisión.

### 3.5.4 Determinación del rendimiento cuántico de oxígeno singlete

La determinación de la foto-oxidación del DMA se realizó en una cubeta de cuarzo de paso óptico 1cm midiendo el decaimiento en la absorbancia a 379nm. Soluciones de DMA y fotosensibilizador (Abs entre 0,1 y 0,2 de su  $\lambda_{\max}$ ) en 2,5mL de DMF se irradiaron con luz roja ( $\lambda = 625 \text{ nm}$ ) a diferentes tiempos. Se realizó una gráfica de la degradación del DMA, es decir, de su disminución de absorción a  $\lambda: 379 \text{ nm}$  en función del tiempo. El  $\Phi_{\Delta}$  fue calculado comparando la pendiente de las Pcs con la pendiente obtenida para el compuesto de referencia, ZnPc según la siguiente ecuación:

$\Phi_{\Delta}^{\text{ref}}$  : rendimiento cuántico de la referencia ZnPc 0,56

$k_{\text{obs}}^{\text{ref}}$  : constante de velocidad de la referencia (ZnPc) determinada experimentalmente

$k_{\text{obs}}^{\text{sens}}$  : constante de velocidad de la Pc a cuantificar

$A_{\lambda}^{\text{ref}}$  : absorbancia de ZnPc

$A_{\lambda}^{\text{sens}}$  : absorbancia de la Pc a determinar

$$\Phi_{\Delta}^{\text{sens}} = \frac{\Phi_{\Delta}^{\text{ref}} k_{\text{obs}}^{\text{sens}} A_{\lambda}^{\text{ref}}}{k_{\text{obs}}^{\text{ref}} A_{\lambda}^{\text{sens}}}$$

La cinética de fotooxidación fue estudiada siguiendo el descenso en los valores de absorbancia a  $\lambda_{\max} = 379 \text{ nm}$  para el DMA. La constante de velocidad observada ( $k_{\text{obs}}$ ) se obtuvo mediante el análisis de regresión lineal por cuadrados mínimos del gráfico semilogarítmico de  $\ln (A_0/A_T)$  en función del tiempo. ZnPc fue utilizada como referencia para la determinación del rendimiento cuántico de  $^1\text{O}_2$ .<sup>38</sup>

### 3.6 Bibliografía

1. Li, X.; Zheng, B.-D.; Peng, X.-H.; Li, S.-Z.; Ying, J.-W.; Zhao, Y.; Huang, J.-D.; Yoon, J., Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: Developments in the last five years. *Coordination Chemistry Reviews* **2019**, *379*, 147-160.
2. Dumoulin, F.; Durmuş, M.; Ahsen, V.; Nyokong, T., Synthetic pathways to water-soluble phthalocyanines and close analogs. *Coordination Chemistry Reviews* **2010**, *254* (23), 2792-2847.
3. Singh, S.; Aggarwal, A.; Bhupathiraju, N. V.; Arianna, G.; Tiwari, K.; Drain, C. M., Glycosylated Porphyrins, Phthalocyanines, and Other Porphyrinoids for Diagnostics and Therapeutics. *Chemical reviews* **2015**, *115* (18), 10261-10306.
4. Miletin, M.; Zimcik, P.; Novakova, V., Photodynamic properties of aza-analogues of phthalocyanines. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2018**, *17* (11), 1749-1766.
5. Sakamoto, K.; Ohno-Okumura, E., Syntheses and Functional Properties of Phthalocyanines. *Materials* **2009**, *2* (3), 1127-1179.
6. Gouterman, M., *The Porphyrins Vol. 3: Physical Chemistry, Part A*. Academic Press, New York: **1978**.
7. Huang, T.-H.; Rieckhoff, K. E.; Voigt, E. M., New singlets in the phthalocyanines. *The Journal of Physical Chemistry* **1981**, *85* (22), 3322-3326.
8. Huang, T. H.; Rieckhoff, K.; Voigt, E., Shpol'skii effect and vibronic spectra of the phthalocyanines. *The Journal of Chemical Physics* **1982**, *77* (7), 3424-3441.
9. Kobayashi, N.; Konami, H., Molecular orbitals and electronic spectra of benzo-fused and related porphyrin analogues. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2001**, *5* (03), 233-255.
10. Kobayashi, N.; Konami, H.; Leznoff, C.; Lever, A., *Phthalocyanines: Properties and Applications*. by CC Leznoff and ABP Lever, VCH, New York **1996**, *4*.
11. Isago, H., *Optical spectra of phthalocyanines and related compounds*. Springer: 2015.
12. Lukyanets, E. A.; Nemykin, V. N., The key role of peripheral substituents in the chemistry of phthalocyanines and their analogs. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2010**, *14* (01), 1-40.
13. Çakır, V.; Göksel, M.; Durmuş, M.; Biyiklioglu, Z., Synthesis and photophysicochemical properties of novel water soluble phthalocyanines. *Dyes and Pigments* **2016**, *125*, 414-425.
14. Zheng, B.-Y.; Lin, T.; Yang, H.-H.; Huang, J.-D., Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by a series of novel axially di-substituted silicon (IV) phthalocyanines. *Dyes and Pigments* **2013**, *96* (2), 547-553.
15. Leznoff, C. C.; McKeown, N. B., Preparation of substituted tetrabenzotriazaporphyrins and a tetranaphthotriazaporphyrin: a route to mono-meso-substituted phthalocyanine analogs. *The Journal of organic chemistry* **1990**, *55* (7), 2186-2190.
16. ISHII, K.; KOBAYASHI, N., The Photophysical Properties of 1 02 Phthalocyanines and Related Compounds. *The Porphyrin Handbook: Phthalocyanines: Spectroscopic and Electrochemical Characterization* **2000**, *16*, 1.

17. Hofman, J. W.; van Zeeland, F.; Turker, S.; Talsma, H.; Lambrechts, S. A.; Sakharov, D. V.; Hennink, W. E.; van Nostrum, C. F., Peripheral and axial substitution of phthalocyanines with solketal groups: synthesis and in vitro evaluation for photodynamic therapy. *Journal of medicinal chemistry* **2007**, *50* (7), 1485-1494.
18. Ke, M.-R.; Huang, J.-D.; Weng, S.-M., Comparison between non-peripherally and peripherally tetra-substituted zinc (II) phthalocyanines as photosensitizers: Synthesis, spectroscopic, photochemical and photobiological properties. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2009**, *201* (1), 23-31.
19. Kobayashi, N.; Ogata, H.; Nonaka, N.; Luk'yanets, E. A., Effect of peripheral substitution on the electronic absorption and fluorescence spectra of metal-free and zinc phthalocyanines. *Chemistry* **2003**, *9* (20), 5123-5134.
20. Snow, A. W., Phthalocyanine Aggregation 109. *The Porphyrin Handbook: Phthalocyanines: Properties and Materials* **2000**, *17*, 129.
21. Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R., Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **2004**, *1* (4), 279-293.
22. Ochsner, M., Light scattering of human skin: A comparison between zinc(II)—phthalocyanine and photofrin II®. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1996**, *32* (1), 3-9.
23. Kobayashi, N.; Sasaki, N.; Higashi, Y.; Osa, T., Regiospecific and nonlinear substituent effects on the electronic and fluorescence spectra of phthalocyanines. *Inorganic Chemistry* **1995**, *34* (7), 1636-1637.
24. Ogunsipe, A.; Maree, D.; Nyokong, T., Solvent effects on the photochemical and fluorescence properties of zinc phthalocyanine derivatives. *Journal of Molecular Structure* **2003**, *650* (1-3), 131-140.
25. Nyokong, T., Desired properties of new phthalocyanines for photodynamic therapy. *Pure and Applied Chemistry* **2011**, *83* (9), 1763-1779.
26. Nyokong, T.; Ahsen, V., *Photosensitizers in medicine, environment, and security*. Springer Science & Business Media: 2012.
27. Cakmak, Y.; Kolemen, S.; Duman, S.; Dede, Y.; Dolen, Y.; Kilic, B.; Kostereli, Z.; Yildirim, L. T.; Dogan, A. L.; Guc, D.; Akkaya, E. U., Designing Excited States: Theory-Guided Access to Efficient Photosensitizers for Photodynamic Action. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50* (50), 11937-11941.
28. Lacey, J. A.; Phillips, D.; Milgrom, L. R.; Yahioğlu, G.; Rees, R. D., Photophysical Studies of Some 5, 10, 15, 20-Tetraarylethynylporphyrinatozinc (II) Complexes as Potential Lead Compounds for Photodynamic Therapy. *Photochemistry and photobiology* **1998**, *67* (1), 97-100.
29. Rosenthal, I., Phthalocyanines as photodynamic sensitizers. *Photochemistry and photobiology* **1991**, *53* (6), 859-870.
30. Nonell, S.; Flors, C., *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences*. Royal Society of Chemistry: **2016**; Vol. 1.

31. Claessens, C. G.; González-Rodríguez, D.; Torres, T., Subphthalocyanines: Singular Nonplanar Aromatic Compounds Synthesis, Reactivity, and Physical Properties. *Chemical reviews* **2002**, *102* (3), 835-854.
32. Sastre, A.; Torres, T.; Díaz-García, M. A.; Agulló-López, F.; Dhenaut, C.; Brasselet, S.; Ledoux, I.; Zyss, J., Subphthalocyanines: Novel Targets for Remarkable Second-Order Optical Nonlinearities. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118* (11), 2746-2747.
33. Li, Z.; Lieberman, M.; Hill, W., XPS and SERS study of silicon phthalocyanine monolayers: umbrella vs octopus design strategies for formation of oriented SAMs. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2001**, *17* (16), 4887-4894.
34. Soriano, J.; Villanueva, A.; Stockert, J. C.; Canete, M., Vehiculization determines the endocytic internalization mechanism of Zn(II)-phthalocyanine. *Histochemistry and cell biology* **2013**, *139* (1), 149-160.
35. Fabris, C.; Valduga, G.; Miotto, G.; Borsetto, L.; Jori, G.; Garbisa, S.; Reddi, E., Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer research* **2001**, *61* (20), 7495-7500.
36. Maree, S. E.; Nyokong, T., Syntheses and photochemical properties of octasubstituted phthalocyaninato zinc complexes. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2001**, *5* (11), 782-792.
37. Savoie, H.; Figliola, C.; Marchal, E.; Crabbe, B. W.; Hallett-Tapley, G. L.; Boyle, R. W.; Thompson, A., Photo-induced anticancer activity and singlet oxygen production of prodigiosenes. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2018**, *17* (5), 599-606.
38. Spiller, W.; Kliesch, H.; Wöhrle, D.; Hackbarth, S.; Röder, B.; Schnurpfeil, G., Singlet oxygen quantum yields of different photosensitizers in polar solvents and micellar solutions. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **1998**, *2* (2), 145-158.
39. Tempesti, T. C.; Stockert, J. C.; Durantini, E. N., Photosensitization ability of a water soluble zinc(II)tetramethyltetrapyrrolineporphyrinium salt in aqueous solution and biomimetic reverse micelles medium. *The journal of physical chemistry. B* **2008**, *112* (49), 15701-15707.



---

## Capítulo 4

---

# Aplicación de Zn-ftalocianinas en Terapia Fotodinámica Antimicrobiana *in vitro*.

4.1	Introducción .....	85
4.2	Objetivos .....	88
4.3	Resultados y discusión.....	90
4.3.1	Experimentos control de terapia fotodinámica antimicrobiana <i>in vitro</i> .....	91
4.3.2	Ensayos de Terapia Fotodinámica Antimicrobiana .....	92
4.3.3	Microscopía de transmisión electrónica en KPC .....	96
4.3.4	Concentración mínima inhibitoria (CIM).....	96
4.4	Conclusiones.....	97
4.5	Sección experimental .....	98
4.5.1	Fotosensibilizadores .....	98
4.5.2	Fuente de luz .....	98
4.5.3	Cepas y condiciones de cultivo bacteriano .....	98
4.5.4	Inactivación fotodinámica <i>in vitro</i> . .....	99
4.5.5	Microscopía de transmisión electrónica .....	100
4.5.6	Determinación de la concentración inhibitoria mínima .....	100
4.6	Bibliografía.....	101



## 4.1 Introducción

Los patógenos resistentes a los antimicrobianos están aumentando rápidamente y desarrollando resistencia a la mayoría de los agentes antimicrobianos disponibles. La evolución de la resistencia a los antimicrobianos no solo es un fenómeno biológico natural, sino también el resultado de múltiples factores que incluyen el uso generalizado e inadecuado.<sup>1</sup> La resistencia de las bacterias patógenas a múltiples fármacos se ha convertido en una seria amenaza para la salud pública.<sup>2,3</sup>

Las bacterias han desarrollado una envoltura bacteriana sofisticada y compleja que las protege, pero permite el paso selectivo de nutrientes desde el exterior y productos de desecho desde el interior.<sup>4</sup> Las diferencias en la morfología de la pared bacteriana, las dividen en dos clases principales dependiendo de su respuesta a la tinción de Gram, como se ilustra en la Figura 1. Las bacterias Gram-negativas y positivas difieren en la composición de su superficie externa y responden de manera diferente a los agentes antimicrobianos.<sup>5,6</sup>

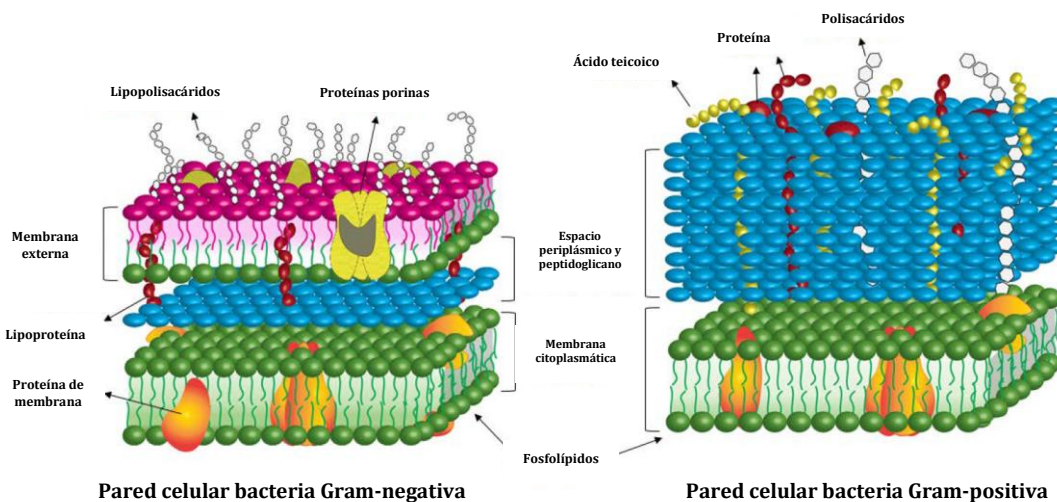


Figura 1. Ilustración de pared celular de bacteria Gram-negativa (izquierda) y Gram-positiva. Imagen extraída de *J Clin Transl Res* 2015; 1 (3):140-167.<sup>7</sup>

En 2014, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó un informe advirtiendo que se acerca la era "post-antibióticos", "en la cual las lesiones menores y las infecciones comunes pueden causar la muerte".<sup>8</sup> Super bacterias Gram-positivas y Gram-negativas como *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter*, los llamados patógenos "ESKAPE" (denominados así, por las iniciales de las bacterias pertenecientes a este grupo), son capaces de resistir casi todos los tipos/clases de antibióticos. Por lo tanto, desarrollar enfoques

novedosos para combatir las bacterias resistentes a múltiples fármacos se ha vuelto cada vez más importante.

*Klebsiella pneumoniae*, bacteria Gram-negativa, se ha vuelto de interés, debido a su propensión a adquirir resistencia a los antimicrobianos.<sup>9</sup> *K. pneumoniae* produce una serie de factores de virulencia que contribuyen a la patogenicidad, es decir a la capacidad que tiene la bacteria para producir enfermedad en un huésped. En la Figura 2 se muestra un esquema de una célula bacteriana con algunos factores de virulencia estructurales como cápsula, fimbrias y flagelos. Se considera que la cápsula (capa de polisacáridos) y las fimbrias son componentes estructurales prominentes de la superficie celular de *K. pneumoniae* que juegan un papel importante en su supervivencia y patogenicidad.<sup>10</sup>

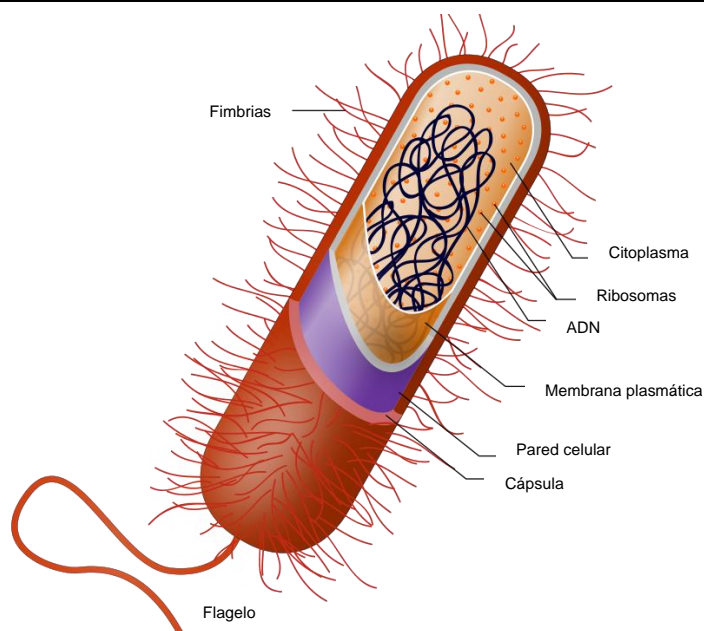


Figura 2. Esquema de célula bacteriana con cápsula, fimbrias y flagelo. Imagen extraída del libro Biology 11<sup>th</sup> edition.<sup>11</sup>

Los antibióticos de la clase de carbapenems se han establecido como agentes de último recurso en el tratamiento de infecciones generadas por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas con resistencia de amplio espectro, y han sido utilizados con gran frecuencia como la única terapia efectiva. Sin embargo, durante las últimas décadas, ha surgido resistencia a carbapenems en enterobacterias. Las enterobacterias resistentes a carbapenems difieren de la mayoría de los otros patógenos bacterianos resistentes a múltiples fármacos siendo que no existe un tratamiento confiable.<sup>12,13</sup>

*Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas (KPC), es un grupo emergente de enterobacterias altamente resistentes a los medicamentos que causan infecciones asociadas con una morbilidad y mortalidad significativas. Hidrolizan eficazmente las penicilinas, todas las cefalosporinas, monobactamas, carbapenems e incluso los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Las bacterias que producen estas enzimas generalmente solo son susceptibles a unos pocos antibióticos, y existe una alta mortalidad entre los pacientes con infecciones en el torrente sanguíneo causadas por estos microorganismos. KPC es un patógeno nosocomial frecuente, siendo la cuarta y quinta causa más frecuente de neumonía y bacteriemia.<sup>14</sup> Actualmente, las opciones para tratar a los pacientes infectados con KPC son limitadas.<sup>15</sup> En 2017, la OMS incluyó la KPC como Prioridad 1: CRÍTICA en la lista de patógenos con prioridad global para guiar la investigación, el descubrimiento y el desarrollo de nuevos antibióticos.<sup>16</sup>

La terapia fotodinámica antimicrobiana (TFDA) ha surgido como una terapia alternativa para el tratamiento de diferentes clases de microorganismos.<sup>7</sup> TFDA, se basa en la aplicación de un fotosensibilizador (PS) no tóxico que se puede excitar con luz visible de longitud de onda adecuada para generar oxígeno singlete o especies reactivas de oxígeno (ROS).<sup>17,18,19</sup> Estas especies reactivas son capaces de generar daño celular y como consecuencia muerte microbiana.<sup>20</sup> De esta manera, siguiendo el tratamiento adecuado, un PS, puede causar la muerte de microorganismos tales como bacterias, hongos, levaduras y virus.<sup>21</sup>

Los antibióticos tradicionales a menudo utilizan un mecanismo en el que los compuestos se dirigen a una membrana específica o componentes intra celulares en bacterias, ya sean proteínas, lípidos o ADN, para detener el crecimiento o favorecer la muerte celular. Por ejemplo, la penicilina inhibe la formación de peptidoglicanos, componentes de la pared celular.<sup>22</sup> En cambio, los PS utilizados para TFDA típicamente se distribuyen a múltiples compartimentos extracelulares o intracelulares (Figura 3). Además, el oxígeno singlete y/o ROS pueden migrar fuera del sitio de formación. Como resultado, varios componentes del metabolismo celular se ven interrumpidos, lo que culmina en la muerte celular.<sup>7</sup>

La unión del PS a la célula bacteriana y su incorporación dependen de la especie bacteriana. Tanto las bacterias Gram-positivas como las Gram-negativas tienen una superficie celular globalmente cargada negativamente compuesta de diferentes estructuras superficiales (Figura 1).<sup>23</sup> Debido a la estructura distintiva de la envoltura celular, las bacterias Gram-negativas son menos propensas a incorporar compuestos exógenos ya que

poseen una membrana externa adicional que constituye una barrera de permeabilidad impartida por los lipopolisacáridos. A diferencia de estas, las bacterias Gram-positivas, tienen una capa de peptidoglicano gruesa pero porosa en la superficie externa.<sup>7</sup>

Numerosos estudios indican que las bacterias Gram-positivas son susceptibles a la TFDA<sup>24,25,26</sup>, sin embargo las bacterias Gram-negativas son resistentes a muchos PSs que sí son activos frente a otros microorganismos, incluso aplicados en células tumorales.<sup>21</sup> Se ha demostrado, que la TFDA podría ser efectiva en bacterias Gram-negativas si se aplica un PS catiónico,<sup>27,28,29</sup> o si la membrana bacteriana es permeabilizada usando por ejemplo, nanopeptidos de polimixina<sup>30</sup> o Tris/EDTA<sup>31</sup> junto a un PS no catiónico.

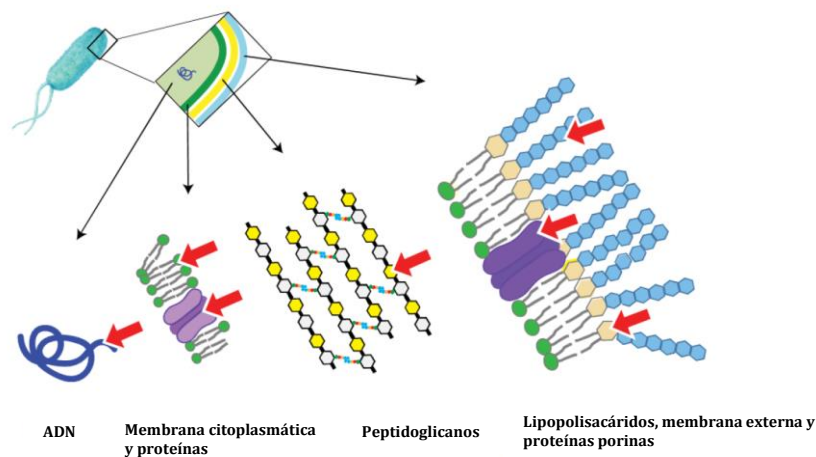


Figura 3. Descripción de la localización de los PSs en células bacterianas TFDA. Imagen extraída de Journal of Clinical and Translational Research 2015; 1 (3):140-167.<sup>7</sup>

A lo largo del tiempo, se han estudiado varias clases de fotosensibilizadores en TFDA<sup>7</sup>. Entre ellos, las ftalocianinas han mostrado importantes aplicaciones como fotosensibilizadores frente a microorganismos resistentes a múltiples fármacos, como *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Candida albicans*, virus de la influenza A (H1N1) y virus del herpes simple tipo 1.<sup>32,33,34,35,36,37</sup>

## 4.2 Objetivos

Teniendo presente las características de las paredes bacterianas y las afinidades con diversos fotosensibilizadores, se planteó como objetivo general de este capítulo “Evaluar

distintas ftalocianinas como agentes antimicrobianos en TFDA y el modo en que afecta a dicha actividad la presencia de cargas en la molécula”.

Para cumplir con el objetivo principal se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Analizar la relación estructura-actividad de las Pcs con diversidad estructural sintetizadas previamente.
- Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* en una cepa Gram-negativa sensible.
- Determinar la actividad en una cepa Gram-negativa con mayor complejidad estructural y mecanismos de resistencia a antibióticos.
- Establecer la concentración inhibitoria mínima (CIM) para la Ftalocianina más activa.

### 4.3 Resultados y discusión

Con el fin de cumplir con los objetivos propuestos, se estudiaron tres ftalocianinas con diferentes sustituyentes (Figura 4) para evaluar *in vitro* su actividad en TFDA. Se relacionó una neutra, ZnPc, que no posee sustituyentes; y dos catiónicas, una de ellas liposoluble, TMAZnPc, y la otra, soluble en agua ZnTM2,3PyPz. Los experimentos de TFDA se realizaron en colaboración la Bioquímica Romina Clementi del Hospital Policlínico Policial de la Ciudad de Córdoba.

Las tres Pcs aplicadas en TFDA se sintetizaron como se indica en el capítulo 2. Las soluciones de ftalocianinas para realizar los experimentos *in vitro*, se prepararon en DMF para ZnPc y TMAZnPc, o agua para ZnTM2,3PyPz y se almacenaron bajo refrigeración en oscuridad.

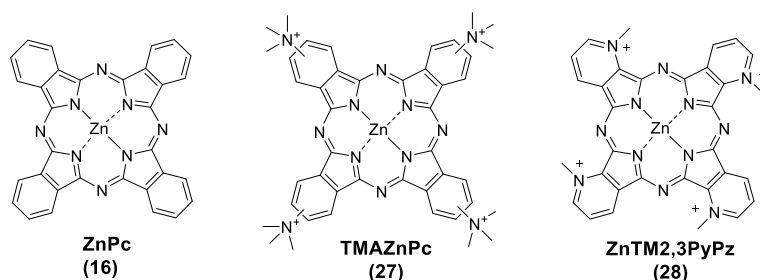


Figura 4. Estructura de las Pcs utilizadas para la inactivación fotodinámica de bacterias *in vitro*

La actividad fotodinámica, se probó en dos bacterias Gram-negativas, *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Klebsiella Pneumoniae* (*K. pneumoniae*). Las cepas que se utilizaron fueron una de referencia *E. coli* ATCC 25922 (sensible) y una cepa clínica proporcionada por el Hospital Policlínico Policial de Córdoba (Córdoba, Argentina) de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas; con resistencia a penicilinas, cefalosporinas de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> generación, carbapenems, aztreonam, flouroquinolonas, cotrimoxazol y aminoglucósidos. En la Figura 5 pueden observarse las fotos correspondientes a los cultivos de las bacterias ensayadas.

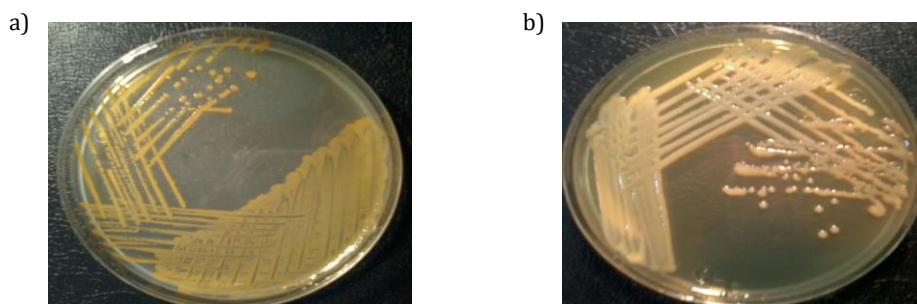


Figura 5. Cultivos en Agar de tripteina de soja de a) *E. coli* y b) KPC



### 4.3.1 Experimentos control de terapia fotodinámica antimicrobiana *in vitro*

Uno de los parámetros a evaluar en TFDA, es la toxicidad en oscuridad del PS, es decir, que sean inocuos en ausencia de irradiación. Para ello, se ensayaron los controles de bacterias con las Pcs en oscuridad. Estos controles se denominaron C1 y se determinaron para cada Pc, en ambas bacterias (Figura 6).

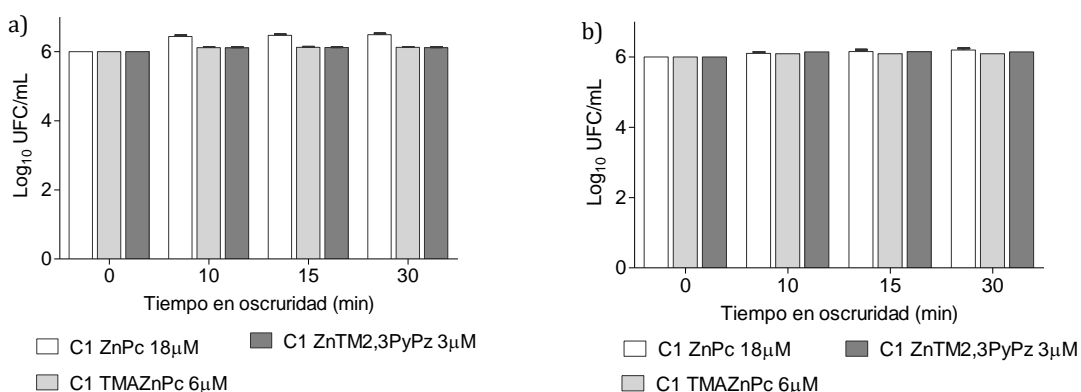


Figura 6. Control C1. Experimentos control de toxicidad en oscuridad en a) *E. coli* ATCC 25922; b) *K. pneumoniae* KPC

Además, se realizaron los controles para evaluar la toxicidad del solvente y de la irradiación. Este control, se denominó C2, y se realizó sin PS, con DMF y a los tres tiempos de irradiación que se utilizaron posteriormente en la TFDA (Figura 7).

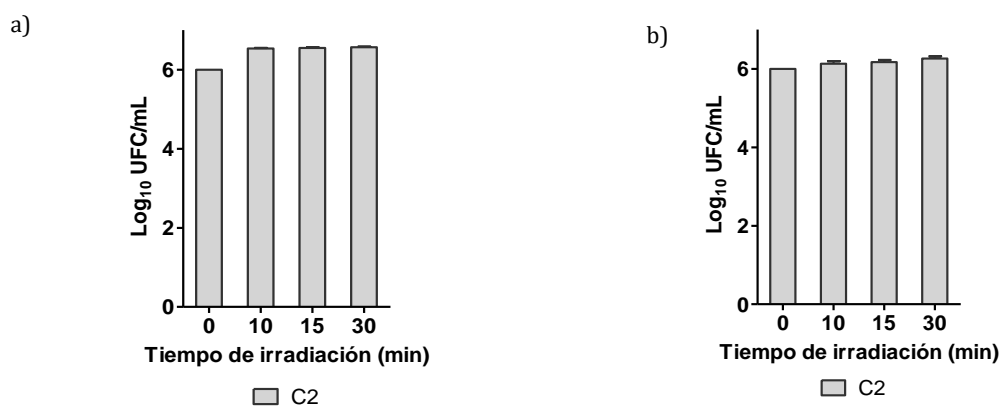


Figura 7. Control C2. Experimentos control de solvente y dosis de luz en a) *E. coli* ATCC 25922; b) *K. pneumoniae* KPC

Como puede observarse en las Figuras 6 y 7, los experimentos de control tanto C1 como C2 mostraron que la viabilidad de *E. coli* y *K. pneumoniae* no disminuyó después de 30 minutos de incubación con las Pcs y 10, 15 y 30 min extras sin irradiación (que

corresponden a los tiempos de irradiación de los ensayos *in vitro* 12,18 y 37 J/cm<sup>2</sup>); o con irradiación y DMF sin Pc con una dosis de 12, 18 y 37 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Teniendo presente que los tiempos de reproducción de esta bacteria son cortos, ~25min, en algunos casos, se observa un incremento en la viabilidad bacteriana lo que indica que la bacteria no ve afectada su funcionalidad por ninguno de los dos parámetros control ensayados.

#### 4.3.2 Ensayos de Terapia Fotodinámica Antimicrobiana

Los resultados de los ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de las tres Pcs, en *E. coli* se muestran en la Figura 8; observándose un claro efecto citotóxico en las bacterias expuestas a la combinación de luz y Pcs. La fotoinactivación fue dependiente de las dosis de luz. Por lo tanto, utilizando una dosis de luz más baja (12 J/cm<sup>2</sup>), la fracción de supervivencia de *E. coli* tratada es mayor. Además, la actividad de las Pcs catiónicas es considerablemente mayor que la de ZnPc. Frente a *E. coli* se utilizaron concentraciones iniciales de 3 μM de Pcs y se incrementaron en 3 μM hasta alcanzar una disminución en 3 log<sub>10</sub> UFC/mL o no exceder seis veces la concentración inicial.

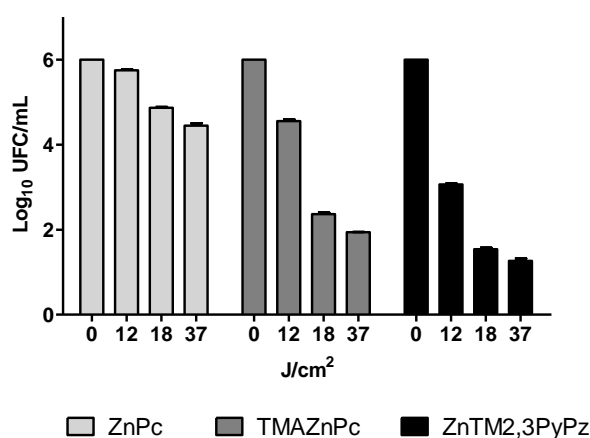


Figura 8. Efectos de la inactivación fotodinámica de *E. coli* a diferentes tiempos de irradiación con diferentes ftalocianinas luego de 30 min de incubación. ZnPc (18 μM), TMAZnPc (6 μM) y ZnTM2,3PyPz (3 μM)

La eficiencia de la fotoinactivación se evaluó en función de la disminución del número de bacterias viables (log<sub>10</sub> UFC/mL) en las muestras analizadas y de control. Se definió actividad significativa a una reducción de 3 log<sub>10</sub> UFC/mL, lo que corresponde al 99,9% de muerte bacteriana.<sup>38</sup>

ZnTM2,3PyPz produce una disminución de 4,7 log<sub>10</sub> de la supervivencia bacteriana de *E. coli*, cuando los cultivos se irradian con una dosis de 37 J/cm<sup>2</sup>. Esta reducción representa el 99,998% de la inactivación bacteriana. El efecto bactericida para esta Pc se puede observar con una dosis de luz más baja, solo se necesitaron 18 J/cm<sup>2</sup> para generar el 99,995% de la inactivación bacteriana. Por otra parte, TMAZnPc (catiónica), conduce a una disminución de 4,1 log<sub>10</sub> (99,992% de inactivación bacteriana) con una dosis de luz de 37 J/cm<sup>2</sup>. Estas condiciones, determinaron una disminución muy baja en la viabilidad bacteriana utilizando ZnPc, generando, una reducción de 1,5 log<sub>10</sub> que representa el 96,91% de la inactivación bacteriana. Esto indica que ZnPc en estas condiciones no genera la reducción de 3 log<sub>10</sub> de UFC/mL, valor mínimo que se estableció para considerar la eficiencia de los PSs.<sup>38</sup>

La inactivación fotodinámica de KPC con diferentes tiempos de irradiación para las tres Pcs estudiadas se muestra en la Figura 9; las concentraciones finales de Pcs fueron las mismas que para *E. coli*. La fotoinactivación de KPC tratada con ZnTM2,3PyPz fue considerablemente más alta que al tratarla con ZnPc y TMAZnPc. Con una dosis de irradiación de 37 J/cm<sup>2</sup> con ZnTM2,3PyPz (3 μM), la viabilidad de KPC disminuyó 99,995% (4,3 log<sub>10</sub> disminución). Utilizando TMAZnPc (6 μM), se observó una leve disminución en la viabilidad bacteriana de 97,48% (disminución de 1,6 log<sub>10</sub>), mientras que ZnPc (18 μM) produjo solo una disminución de 0,7 log<sub>10</sub> (80,05% de muerte bacteriana) con una concentración 6 veces mayor que la utilizada de ZnTM2,3PyPz.

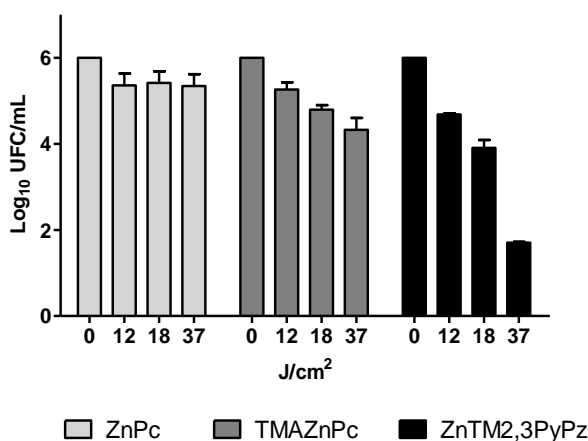


Figura 9. Efectos de la inactivación fotodinámica de KPC a diferentes tiempos de irradiación con diferentes ftalocianinas luego de 30 min de incubación. ZnPc (18 μM), TMAZnPc (6 μM) y ZnTM2,3PyPz (3 μM).

En la Figura 10, se muestran fotos correspondientes a la disminución progresiva de las colonias de KPC al ser tratadas con ZnTM2,3PyPz. La placa control, no fue irradiada y las tres restantes fueron irradiadas durante 10, 15 y 30 min (12, 18 y 37 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente). Como se puede observar, a medida que aumentan los tiempos de irradiación, las colonias disminuyen.

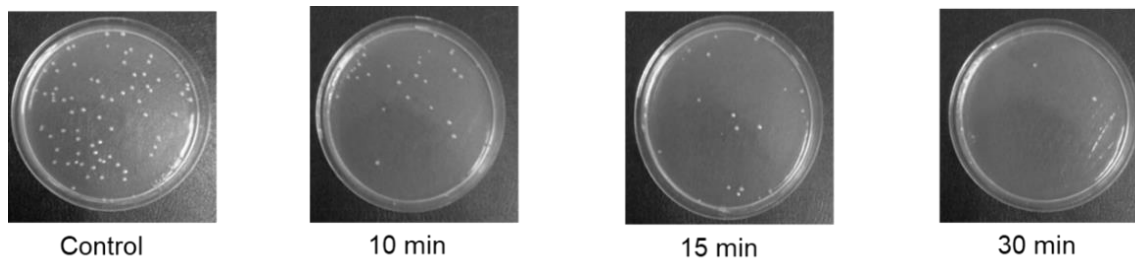


Figura 10. Colonias de KPC incubadas por 30 min con ZnTM2,3PyPz a diferentes tiempos de irradiación.

Teniendo presente que en los experimentos control, la población bacteriana no se vio afectada, la disminución en la viabilidad obtenida después de la aplicación del PS y posterior irradiación, es producida por el efecto de fotosensibilización de las Pcs. La fotoinactivación fue dependiente de la dosis de luz administrada. Una dosis de luz más baja (12 J/cm<sup>2</sup>), genera una mayor supervivencia, es decir una menor reducción de log<sub>10</sub> UFC/mL.

Si bien ambas bacterias tratadas con TFDA son Gram-negativas, la KPC posee diversos factores que la hacen más resistente a los antimicrobianos, como lo es, la presencia de una cápsula de polisacáridos que le otorga mayor resistencia al intercambio de moléculas desde y hacia el exterior (ver Figura 2). Por lo tanto, la diferencia en la eficiencia de muerte entre *E. coli* y KPC para todas las Pcs puede deberse a la presencia de estos factores de virulencia.<sup>10</sup> Sin embargo, ZnTM2,3PyPz, produce una reducción de 4 log<sub>10</sub> en UFC/mL en los cultivos de KPC.

El comportamiento de las Pcs neutras comparadas con las catiónicas ya ha sido estudiado.<sup>39</sup> En 1990 Bertoloni y colaboradores determinaron que ZnPc era ineficaz contra bacterias Gram-negativas como *E. coli* y tuvo que aplicarse en combinación con agentes perturbadores de la membrana como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o el cloruro de calcio para asegurar el ingreso de la Pc a la célula bacteriana.<sup>31</sup> Estudios posteriores revelaron que la introducción de una carga positiva mejoró considerablemente la afinidad de unión y la eficacia de inactivación en bacterias Gram-positivas, pero también en bacterias Gram-negativas.<sup>27,39</sup>

Como se puede observar, la actividad fotodinámica de las Pcs catiónicas es considerablemente mayor que la de ZnPc (neutra). La actividad fotodinámica más alta de Pcs catiónicas (ZnTM2,3PyPz y TMAZnPc) respecto a la neutra (ZnPc) se atribuye a la interacción con la superficie celular bacteriana cargada negativamente.<sup>23</sup> La superficie aniónica actúa como un anclaje para los PS catiónicos, que se unen más eficientemente por la membrana bacteriana.<sup>21</sup> Por otro lado, cuando el sensibilizador es neutro o aniónico, el efecto fotodinámico es menor, probablemente debido a una menor unión PS-célula.<sup>40</sup>

Entre las dos Pcs catiónicas se evidencia una marcada diferencia de actividad fotodinámica antimicrobiana. Considerando que los experimentos fueron desarrollados en solución de *buffer* fosfato salino (PBS) y que ZnTM2,3PyPz es soluble en agua y TMAZnPc en DMF, la menor actividad observada con TMAZnPc, podría atribuirse a su baja solubilidad en el medio.

En la TFDA, el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) y/o las especies reactivas de oxígeno (ROS), son los responsables de la muerte bacteriana. Si bien los valores de rendimiento cuántico de oxígeno siglete ( $\Phi_\Delta$ ) no difieren sustancialmente en las tres Pcs ensayadas, ZnPc ( $\Phi_\Delta=0,56$ ), TMAZnPc ( $\Phi_\Delta=0,40$ ) y ZnTM2,3PyPz ( $\Phi_\Delta=0.65$ )<sup>41</sup>, es importante señalar que los mismos pueden modificarse significativamente en un medio diferente, disminuyendo principalmente cuando el sensibilizador está parcialmente agregado.<sup>42</sup> Los espectros de absorción de Pcs en PBS muestran una mayor agregación de TMAZnPc y ZnPc en este medio (Figura 11). Mientras que ZnTM2,3PyPz permanece igual que en el agua (ver espectros en Capítulo 3).

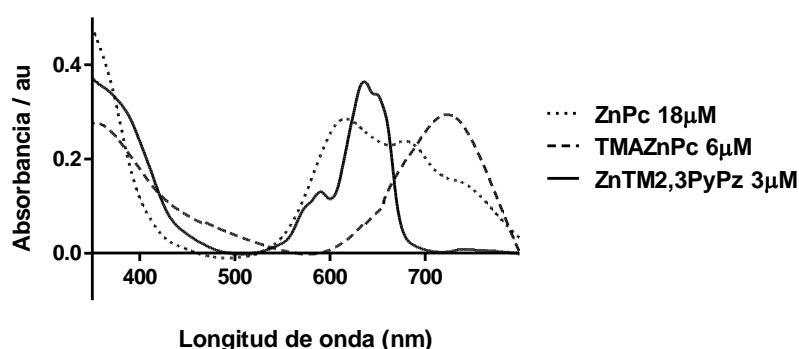


Figura 11. Espectro de absorción de las tres Pcs ensayadas *in vitro*, en PBS como solvente.

### 4.3.3 Microscopia de transmisión electrónica en KPC

Con el fin de observar los efectos de las Pcs y su aplicación en TFDA, se aplicó microscopia de transmisión electrónica (TEM) de KPC (Figura 12). Para ello, se realizaron fotografías de bacterias tratadas con 3  $\mu\text{M}$  de ZnTM2,3PyPz, antes de irradiación (Figura 12a) y luego de 30 min de irradiación (Figura 12 b y c). Como se puede observar en la imagen, hubo cambios en la apariencia de estas bacterias después de ser irradiadas, especialmente en la envoltura bacteriana, que fue significativamente dañada.

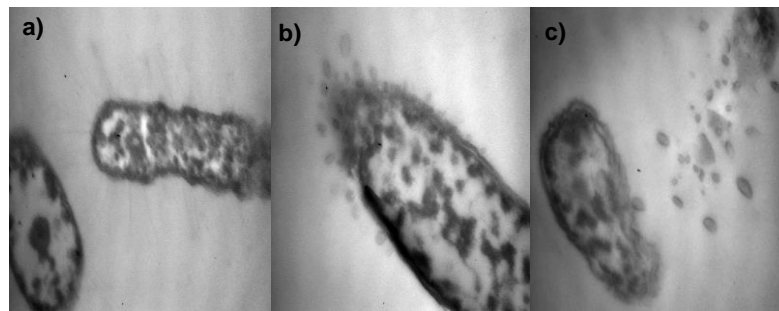


Figura 12. Imágenes TEM (800 x 600) de KPC incubadas por 30 min con 3  $\mu\text{M}$  de ZnTM2,3PyPz a) Sin irradiación (10000), b) y c) 30 min de irradiación (46460).

### 4.3.4 Concentración mínima inhibitoria (CIM)

La concentración inhibitoria mínima, es la concentración más baja de agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo.

Se determinó la CIM solo para ZnTM2,3PyPz ya que fue la Pc que tuvo mayor actividad antibacteriana y se expresó en mg/L. La CIM se determinó mediante el método de microdilución utilizando CLSI. La CIM de ZnTM2,3PyPz para *E. coli* fue de 0.008 mg/L ( $7.39\text{E-}3 \mu\text{M}$ ) y para KPC de 0.12 mg/L ( $1.17\text{E-}1 \mu\text{M}$ ). Teniendo en cuenta que la KPC utilizada en este estudio solo presenta sensibilidad a los antibióticos fosfomicina y tigeciclina y que estos poseen una CIM de 32 mg/L y 1 mg/L respectivamente,<sup>43</sup> los resultados obtenidos para la CIM de ZnTM2,3PyPz frente a KPC son prometedores, ya que su actividad antibacteriana es comparable e incluso más relevante que la de los antibióticos disponibles.

#### 4.4 Conclusiones

Se evaluó y comparó la terapia fotodinámica antimicrobiana *in vitro* de una ftalocianina neutra (ZnPc) y dos catiónicas (TMAZnPc y ZnTM2,3PyPz). La actividad fotodinámica en *E. coli* y KPC fue dependiente del tiempo de irradiación en todos los casos; es decir que, a mayores tiempos de irradiación, menor población bacteriana sobrevivió a la TFDA.

ZnPc (neutra), no alcanzó el objetivo de disminuir al menos 3 Log<sub>10</sub> de UFC/mL en ninguna de las dos cepas estudiadas.

TMAZnPc (catiónica), generó reducción de más de 3 Log<sub>10</sub> de UFC/mL en *E. coli* con 15 min de irradiación; en cambio frente a KPC, la reducción fue de la mitad, incluso a la mayor dosis de luz suministrada.

ZnTM2,3PyPz mostró una efectividad de 99.99% para *E. coli* y KPC con dosis de luz de 18 y 37 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente. La CIM para *E. coli* y KPC fueron más bajas que las de los antibióticos a los cuales es sensible, fosfomicina y tigeciclina.

Estos resultados son prometedores, considerando las grandes dificultades para el tratamiento de bacterias multirresistentes, como las productoras de carbapenemasas, y el impacto que representan para la salud pública. ZnTM2,3PyPz es un fotosensibilizador catiónico soluble en agua, de gran interés, para ser aplicado en TFDA frente a KPC.

## 4.5 Sección experimental

### 4.5.1 Fotosensibilizadores

La síntesis y caracterización de los fotosensibilizadores se desarrolló en el capítulo 2. Las soluciones de ZnPc y TMAZnPc utilizadas en los ensayos *in vitro* se prepararon en DMF y las de ZnTM2,3PyPz en agua; todas las soluciones se almacenaron bajo refrigeración (4°C) en oscuridad.

### 4.5.2 Fuente de luz

La irradiación se realizó utilizando un proyector de diapositivas equipado con una lámpara de 150W (Philips 7158 XHP), el espectro se muestra en la Figura 13. Se agregó un filtro de agua de acrílico de 2,5 cm para absorber el calor. La muestra se colocó a 10cm de la fuente de luz. La tasa de fluencia de luz en el sitio de tratamiento fue de 20,5 mW/cm<sup>2</sup>. Las dosis de luz de 12, 18 y 37 J/cm<sup>2</sup>, corresponden a 10, 15 y 30 min de irradiación. La dosis de luz se determinó utilizando un medidor de luz digital SE-9087 (Extech Instruments).

---

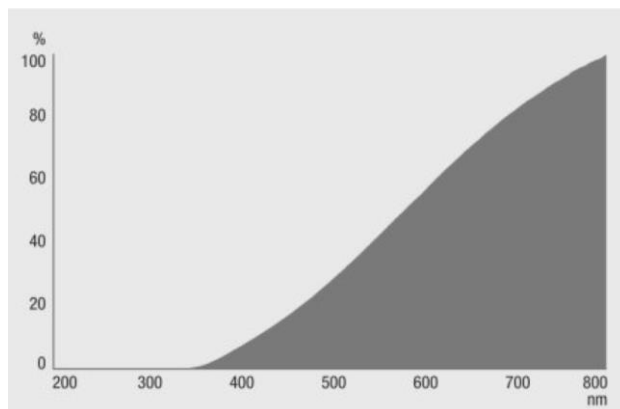


Figura 13. Espectro de la lámpara utilizada para las pruebas *in vitro*.

### 4.5.3 Cepas y condiciones de cultivo bacteriano

Los microorganismos utilizados para este estudio fueron una cepa de referencia de *E. coli*, ATCC 25922, y una cepa clínica proporcionada por el Hospital Policlínico Policial de Córdoba (Córdoba, Argentina) de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa, resistente a penicilinas, cefalosporinas de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> generación, carbapenems, aztreonam, flouroquinolonas, cotrimoxazol y aminoglucósidos; solo presentando la



sensibilidad a la fosfomicina y tegeciclina.<sup>15</sup> La identificación y la prueba de sensibilidad a los antibióticos se realizaron mediante CLSI.<sup>16</sup> La detección de genes de resistencia se realizó mediante PCR. El KPC fue confirmado por la presencia del gen *bla*-KPC. Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (AST) fueron determinadas por el Servicio Antimicrobianos, Departamento de Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) - ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, Ministerio de Salud y Ambiente, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Las cepas se cultivaron en caldo de tripteína de soja (TSB) durante 24 horas a 35 ° C, lo que corresponde a la fase de crecimiento exponencial. Una alícuota de estos cultivos se transfirió asépticamente y se resuspendió en 2 mL de PBS. Luego, la concentración bacteriana se ajustó a 10<sup>8</sup> UFC/mL. Finalmente, el cultivo de bacterias se diluyó 1/100 en PBS (solución madre), correspondiente a ~ 10<sup>6</sup> UFC / mL.

#### 4.5.4 Inactivación fotodinámica *in vitro*.

En todos los experimentos se utilizaron 2 mL de suspensiones bacterianas en PBS (10<sup>6</sup> UFC/mL). Las concentraciones experimentales fueron optimizadas, para *E. coli*, se utilizaron concentraciones iniciales de 3 µM de Pcs y se incrementaron en 3 µM hasta lograr una disminución en 3 log de UFC/mL o no exceder seis veces la concentración inicial. En los ensayos con KPC, se aplicaron las concentraciones finales de Pcs que se utilizaron con *E. coli* (3µM, 6µM y 18µM).

En todos los experimentos de inactivación fotodinámica se utilizaron 2 mL de suspensiones bacterianas en PBS que contenía el fotosensibilizador a la concentración deseada. La concentración bacteriana se ajustó a 10<sup>6</sup> UFC/mL. Las bacterias con Pcs se incubaron durante 30 minutos en la oscuridad a 35 ° C. Luego, los cultivos se expusieron a la luz visible en diferentes intervalos de tiempo utilizando el equipo indicado anteriormente. Después de la irradiación, se extrajeron muestras de 100 µL y se diluyeron en serie (1/10, 1/100, 1/1000) en PBS. Se distribuyeron alícuotas (100 µl) sobre agar de tripteína de soja, TSA. Las UFC en cada placa se contaron después de 48 h de incubación a 35°C. Los experimentos se llevaron a cabo en tres días independientes y los datos se expresaron como el promedio de todos los valores obtenidos ± error medio estándar.

Los cultivos se irradiaron utilizando diferentes dosis de luz visible: 12, 18 y 37 J/cm<sup>2</sup> que corresponden a 10, 15 y 30 min de irradiación.

Los experimentos de control, C1 donde se evaluó la toxicidad en oscuridad, y los experimentos C2 en donde se evaluó el efecto del solvente y de la luz, se realizaron con 30 min de incubación y 10, 15 y 30 min extras en oscuridad o con irradiación respectivamente siguiendo la misma metodología descrita para los ensayos de muerte bacteriana.

#### 4.5.5 Microscopía de transmisión electrónica

Las fotos de las bacterias se realizaron con microscopía de transmisión electrónica (TEM). El procesamiento de las muestras y la toma de fotografías, se llevó a cabo en el Centro de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNC.

#### 4.5.6 Determinación de la concentración inhibitoria mínima

La CMI se determinó utilizando el método de microdilución siguiendo el protocolo Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI).<sup>44</sup> La concentración bacteriana se ajustó a  $10^6$  UFC/mL. Se enumeraron pocillos de 1-10, el 1 es el control de crecimiento. A los pocillos 2-10 se agrega 50  $\mu$ L de PBS. En el pocillo 2 se agregan 50  $\mu$ L de ZnTM<sub>2,3</sub>PyPz y se realizan diluciones seriadas a la mitad hasta llegar al pocillo 10. Finalmente, se agregaron 10  $\mu$ L de suspensión bacteriana a todos los pocillos, se incubaron durante 30 minutos en la oscuridad a 35 ° C y luego se irradiaron con 37 J/cm<sup>2</sup>. Las UFC/mL en cada placa se contaron después de 48 h de incubación a 35°C en TSA. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

## 4.6 Bibliografía

1. Rossolini, G. M.; Mantengoli, E., Antimicrobial resistance in Europe and its potential impact on empirical therapy. *Clinical Microbiology and Infection* **2008**, *14* (s6), 2-8.
2. Nyamu, S. N.; Ombaka, L.; Masika, E.; Ng'ang'a, M., Antimicrobial Photodynamic Activity of Phthalocyanine Derivatives. *Advances in Chemistry* **2018**, *2018*.
3. Tabenski, I.; Cieplik, F.; Tabenski, L.; Regensburger, J.; Hiller, K.-A.; Buchalla, W.; Maisch, T.; Späth, A., The impact of cationic substituents in phenalen-1-one photosensitizers on antimicrobial photodynamic efficacy. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2016**, *15* (1), 57-68.
4. Kohanski, M. A.; Dwyer, D. J.; Collins, J. J., How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology* **2010**, *8* (6), 423-435.
5. Jori, G.; Brown, S. B., Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **2004**, *3* (5), 403-405.
6. Malik, Z.; Hanania, J.; Nitzan, Y., Bactericidal effects of photoactivated porphyrins--an alternative approach to antimicrobial drugs. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **1990**, *5* (3-4), 281-293.
7. Liu, Y.; Qin, R.; Zaat, S. A. J.; Breukink, E.; Heger, M., Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. *Journal of clinical and translational research* **2015**, *1* (3), 140-167.
8. Organization, W. H., *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. World Health Organization: 2014.
9. Shon, A. S.; Bajwa, R. P.; Russo, T. A., Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence* **2013**, *4* (2), 107-118.
10. Schembri, M. A.; Blom, J.; Krogfelt, K. A.; Klemm, P., Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and immunity* **2005**, *73* (8), 4626-4633.
11. Peter Raven, G. J., Kenneth Mason, Jonathan Losos, Susan Singer, *Biology*. 11th ed.; 2017.
12. Papp-Wallace, K. M.; Endimiani, A.; Taracila, M. A.; Bonomo, R. A., Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2011**, *55* (11), 4943-4960.
13. Gupta, N.; Limbago, B. M.; Patel, J. B.; Kallen, A. J., Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: Epidemiology and Prevention. *Clinical Infectious Diseases* **2011**, *53* (1), 60-67.
14. Bratu, S.; Landman, D.; Haag, R.; Recco, R.; Eramo, A.; Alam, M.; Quale, J., Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Archives of internal medicine* **2005**, *165* (12), 1430-1435.
15. Munoz-Price, L. S.; Poirel, L.; Bonomo, R. A.; Schwaber, M. J.; Daikos, G. L.; Cormican, M.; Cornaglia, G.; Garau, J.; Gniadkowski, M.; Hayden, M. K.; Kumarasamy, K.; Livermore, D. M.; Maya, J. J.; Nordmann, P.; Patel, J. B.; Paterson, D. L.; Pitout, J.; Villegas, M. V.; Wang, H.; Woodford, N.; Quinn, J. P., Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *The Lancet Infectious Diseases* **2013**, *13* (9), 785-796.
16. *Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis*; Geneva: World Health Organization: 2017;
17. Schweitzer, C.; Schmidt, R., Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen. *Chemical reviews* **2003**, *103* (5), 1685-1758.

18. Macdonald, I. J.; Dougherty, T. J., Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2001**, 5 (2), 105-129.
19. Henderson, B. W.; Dougherty, T. J., How does photodynamic therapy work? *Photochemistry and photobiology* **1992**, 55 (1), 145-157.
20. Sharma, S. K.; Mroz, P.; Dai, T.; Huang, Y.-Y.; St Denis, T. G.; Hamblin, M. R., Photodynamic Therapy for Cancer and for Infections: What Is the Difference? *Israel journal of chemistry* **2012**, 52 (8-9), 691-705.
21. Hamblin, M. R.; O'Donnell, D. A.; Murthy, N.; Rajagopalan, K.; Michaud, N.; Sherwood, M. E.; Hasan, T., Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **2002**, 49 (6), 941-951.
22. Mucsi, Z.; Chass, G. A.; Ábrányi-Balogh, P.; Jójárt, B.; Fang, D.-C.; Ramirez-Cuesta, A. J.; Viskolcz, B.; Csizmadia, I. G., Penicillin's catalytic mechanism revealed by inelastic neutrons and quantum chemical theory. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, 15 (47), 20447-20455.
23. Silhavy, T. J.; Kahne, D.; Walker, S., The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2010**, 2 (5), a000414.
24. Bertoloni, G.; Rossi, F.; Valduga, G.; Jori, G.; Ali, H.; van Lier, J. E., Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on prokaryotic and eukaryotic microbial cells. *Microbios* **1992**, 71 (286), 33-46.
25. de Freitas, L. M.; Lorenzón, E. N.; Cilli, E. M.; de Oliveira, K. T.; Fontana, C. R.; Mang, T. S., Photodynamic and peptide-based strategy to inhibit Gram-positive bacterial biofilm formation. *Biofouling* **2019**, 1-16.
26. Branco, T. M.; Valério, N. C.; Jesus, V. I. R.; Dias, C. J.; Neves, M. G. P. M. S.; Faustino, M. A. F.; Almeida, A., Single and combined effects of photodynamic therapy and antibiotics to inactivate *Staphylococcus aureus* on skin. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **2018**, 21, 285-293.
27. Minnock, A.; Vernon, D. I.; Schofield, J.; Griffiths, J.; Howard Parish, J.; Brown, S. B., Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1996**, 32 (3), 159-164.
28. Akhlyustina, E.; Meerovich, G.; Tiganova, I.; Makarova, E.; Philipova, N.; Romanishkin, I.; Alekseeva, N.; Lukyanets, E.; Romanova, Y. M.; Loschenov, V. In *New cationic photosensitizers: photophysical properties and results of preliminary studies of antibacterial efficacy*, Journal of Physics: Conference Series, IOP Publishing: **2019**; p 012033.
29. Hurst, A. N.; Scarbrough, B.; Saleh, R.; Hovey, J.; Ari, F.; Goyal, S.; Chi, R. J.; Troutman, J. M.; Vivero-Escoto, J. L., Influence of Cationic meso-Substituted Porphyrins on the Antimicrobial Photodynamic Efficacy and Cell Membrane Interaction in *Escherichia coli*. *International journal of molecular sciences* **2019**, 20 (1), 134.
30. Nitzan, Y.; Gutterman, M.; Malik, Z.; Ehrenberg, B., Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *Photochemistry and photobiology* **1992**, 55 (1), 89-96.
31. Bertolini, G.; Rossi, F.; Valduga, G.; Jori, G.; Van Lier, J., Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* **1990**, 71 (1-2), 149-155.
32. Di Palma, M. A.; Alvarez, M. G.; Durantini, E. N., Photodynamic Action Mechanism Mediated by Zinc(II) 2,9,16,23-Tetrakis[4-(N-methylpyridyloxy)]phthalocyanine in *Candida albicans* Cells. *Photochemistry and photobiology* **2015**, 91 (5), 1203-1209.

33. Li, X. S.; Guo, J.; Zhuang, J. J.; Zheng, B. Y.; Ke, M. R.; Huang, J. D., Highly positive-charged zinc(II) phthalocyanine as non-aggregated and efficient antifungal photosensitizer. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2015**, *25* (11), 2386-2389.
34. Calzavara-Pinton, P.; Rossi, M. T.; Sala, R.; Venturini, M., Photodynamic antifungal chemotherapy. *Photochemistry and photobiology* **2012**, *88* (3), 512-522.
35. Ke, M. R.; Eastel, J. M.; Ngai, K. L.; Cheung, Y. Y.; Chan, P. K.; Hui, M.; Ng, D. K.; Lo, P. C., Photodynamic inactivation of bacteria and viruses using two monosubstituted zinc(II) phthalocyanines. *European journal of medicinal chemistry* **2014**, *84*, 278-283.
36. Spesia, M. B.; Rovera, M.; Durantini, E. N., Photodynamic inactivation of Escherichia coli and Streptococcus mitis by cationic zinc (II) phthalocyanines in media with blood derivatives. *European journal of medicinal chemistry* **2010**, *45* (6), 2198-2205.
37. Rocha, D. M.; Venkatramaiah, N.; Gomes, M. C.; Almeida, A.; Faustino, M. A.; Almeida Paz, F. A.; Cunha, A.; Tome, J. P., Photodynamic inactivation of Escherichia coli with cationic ammonium Zn(II) phthalocyanines. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **2015**, *14* (10), 1872-1879.
38. Grinholc, M.; Szramka, B.; Kurlenda, J.; Graczyk, A.; Bielawski, K. P., Bactericidal effect of photodynamic inactivation against methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus is strain-dependent. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **2008**, *90* (1), 57-63.
39. Scalise, I.; Durantini, E. N., Synthesis, properties, and photodynamic inactivation of Escherichia coli using a cationic and a noncharged Zn(II) pyridyloxyphthalocyanine derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2005**, *13* (8), 3037-3045.
40. Bertoloni, G.; Rossi, F.; Valduga, G.; Jori, G.; van Lier, J., Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on Escherichia coli. *FEMS Microbiol Lett* **1990**, *59* (1-2), 149-155.
41. Tempesti, T. C.; Stockert, J. C.; Durantini, E. N., Photosensitization ability of a water soluble zinc(II)tetramethyltetrapyrrolineporphyrinium salt in aqueous solution and biomimetic reverse micelles medium. *The journal of physical chemistry. B* **2008**, *112* (49), 15701-15707.
42. Milanesio, M. E.; Alvarez, M. G.; Bertolotti, S. G.; Durantini, E. N., Photophysical characterization and photodynamic activity of metallo 5-(4-(trimethylammonium)phenyl)-10,15,20-tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)porphyrin in homogeneous and biomimetic media. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **2008**, *7* (8), 963-972.
43. Pasteran, F.; Lucero, C.; Rapoport, M. J.; Guerriero, L.; Barreiro, I.; Albornoz, E.; Veliz, O.; Corso, A., Tigecycline and intravenous fosfomycin zone breakpoints equivalent to the EUCAST MIC criteria for Enterobacteriaceae. **2012**.
44. Institute, C. a. L. S., Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 9th ed.; CLSI, Ed. Wayne, PA, USA, **2012**.



---

# Capítulo 5

---

## Aplicación *in vitro* de ftalocianinas en Terapia Fotodinámica en células de glioblastoma.

Aplicación <i>in vitro</i> de ftalocianinas en Terapia Fotodinámica en células de glioblastoma.....	105
5.1 Introducción.....	107
5.2 Objetivos.....	109
5.3 Resultados y discusión.....	110
5.3.1 Fotosensibilizadores.....	110
5.3.2 Citotoxicidad en oscuridad de los fotosensibilizadores.....	110
5.3.3 Incorporación intracelular de Pcs.....	111
5.3.4 Localización subcelular.....	112
5.3.5 Fotocitotoxicidad.....	113
5.3.6 Ensayos clonogénicos.....	114
5.3.7 Modo de muerte celular desencadenado por terapia fotodinámica.....	115
5.3.8 Fotocitotoxicidad en otras células de glioma.....	118
5.4 Conclusiones.....	119
5.5 Sección experimental.....	121
5.5.1 Fotosensibilizadores.....	121
5.5.2 Fuente de luz.....	121
5.5.3 Condiciones de cultivo celular.....	121
5.5.4 Determinación de viabilidad celular.....	121

5.5.5	Localización subcelular de PS .....	122
5.5.6	Incorporación intracelular de Pcs .....	122
5.5.7	Citotoxicidad en oscuridad.....	123
5.5.8	Fotocitotoxicidad.....	123
5.5.9	Ensayo clonogénico .....	123
5.5.10	Inmunodetección de caspasa 3 clivada.....	124
5.5.11	Detección de apoptosis y necrosis: tinción de anexina V – Ioduro de propidio .....	124
5.6	Bibliografía.....	125



## 5.1 Introducción

El cáncer es una multiplicación desregulada de células con la consecuencia de un aumento anormal del número de células en órganos particulares. Las etapas iniciales del desarrollo del cáncer generalmente se limitan al órgano de origen, mientras que los tumores avanzados crecen más allá del tejido de origen.<sup>1</sup> El cáncer es un problema importante de salud pública mundial, que produce cada año, más de ocho millones de muertes.<sup>2</sup> La mayoría de las terapias antitumorales carecen de especificidad, lo que significa que afectan tanto a las células cancerosas como a las normales. Además, muchos agentes anticancerígenos son altamente tóxicos y, por lo tanto, su uso se ve limitado. Como resultado de estas deficiencias, muchos tratamientos actuales provocan efectos secundarios, inconvenientes para el paciente debido a dificultades en la administración.<sup>3</sup> A pesar de los enormes esfuerzos, son pocos los medicamentos que puedan cumplir con los múltiples requisitos de transmisión efectiva, alta selectividad y excelente actividad contra el tumor al mismo tiempo.<sup>2</sup>

Los gliomas son los tumores cerebrales primarios más comunes en adultos, considerado como uno de los cánceres más devastadores, con una media de supervivencia de aproximadamente 14,6 meses.<sup>4,5</sup> Los glioblastomas multiforme (clasificados por la Organización Mundial de la Salud como gliomas de grado IV) son el tipo de tumor más común y agresivo del sistema nervioso central y, en Estados Unidos, más de 10.000 nuevos casos son reportados cada año.<sup>6</sup> La ubicación de estos tumores en áreas críticas del cerebro hace que sean difíciles de extirpar mediante cirugía, mientras que la barrera hematoencefálica limita el acceso de los medicamentos al sitio de acción, lo que complica aún más la posibilidad de controlar su crecimiento.<sup>7,8</sup>

El protocolo para el tratamiento de Glioblastomas multiforme implica la resección quirúrgica seguida de quimioterapia y radioterapia.<sup>5,9</sup> Debido a la naturaleza altamente invasiva de estos tumores, la eliminación quirúrgica del tumor primario generalmente no es curativa y la presencia de células infiltrantes conduce al desarrollo de tumores secundarios cercanos o distantes a la ubicación del tumor primario. Al igual que con otros tumores, las células madre del cáncer desempeñan un papel crítico en el crecimiento, mantenimiento y metástasis de los mismos además de estar involucradas en la resistencia a radio y quimioterapia. Incluso, se ha postulado que estas células están asociadas a la potencialidad de recurrencia del tumor luego del tratamiento.<sup>10,11,12</sup>

La terapia fotodinámica (TFD) es una alternativa eficaz para el tratamiento de varios tipos de cáncer,<sup>13</sup> enfermedades microbianas,<sup>14</sup> diagnóstico,<sup>15</sup> como así también para usos

cosméticos.<sup>16</sup> TFD implica la administración de un compuesto no tóxico denominado fotosensibilizador (PS), y luz que conduce a la generación de oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) y/o especies reactivas de oxígeno (ROS) que producen daños en los constituyentes celulares desencadenando muerte celular<sup>17,18</sup> seguida de regresión del tumor.<sup>19,20,21,22</sup> Debido a que estas reacciones se producen solo en el área que absorbe la luz, las respuestas biológicas se limitan al área del cuerpo que se ha irradiado. El PS ideal debe acumularse preferentemente en los tejidos diana y eliminarse rápidamente para evitar efectos secundarios relacionados con la fotosensibilidad.<sup>23</sup>

El propósito principal de aplicar TFD para tratar tumores es desencadenar la destrucción de células tumorales por inducción de muerte celular. Varios factores influyen en el tipo de muerte celular que ocurre después de la TFD: las propiedades fotofísicas, la concentración y la localización subcelular del PS, el oxígeno disponible en el sitio de irradiación, la dosis de luz administrada y el tipo de célula.<sup>24</sup> Posteriormente a la aplicación de la TFD, las células pueden sufrir al menos dos tipos de muerte celular, apoptosis o necrosis. El primero se refiere a la muerte celular fisiológica que se produce sin desencadenar inflamación o respuesta inmunológica, mientras que la necrosis es una forma rápida, no regulada y agresiva de muerte celular, comúnmente asociada con procesos inflamatorios (ver Figura 1).<sup>25</sup>

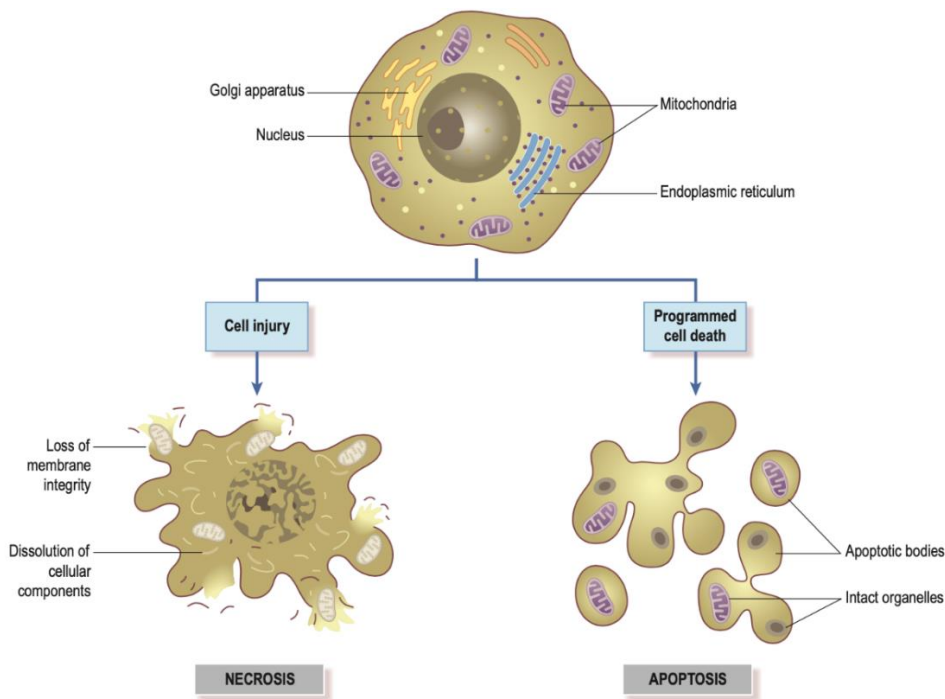


Figura 1. Esquema de células en: a) Apoptosis b) Necrosis. Imágenes extraídas del libro Cellular mechanisms of neurological disease. In Clinical Neuroscience. Chapter 8. 2014; pp 91-103.<sup>26</sup>

Dado que los efectos de la TFD se limitan al sitio de la irradiación, el uso de este enfoque terapéutico para el tratamiento de gliomas se ha convertido en un tema de interés para muchos investigadores. Se han realizado numerosos estudios que muestran la potencialidad de la terapia con diferentes PSs.<sup>27,28,29</sup> Las ftalocianinas (Pcs) y sus derivados han sido considerados excelentes PS, de segunda generación, para TFD en numerosos tipos de tumores. Este tipo de moléculas tienen una fuerte absorción en la región roja e infrarroja cercana del espectro visible, la cual se corresponde con la ventana fototerapéutica, es decir, la longitud de onda en la cual la dispersión de luz en los tejidos es menor y, por lo tanto, la luz que llega al fotosensibilizador es mayor.<sup>30,31</sup> Además, las Pcs presentan una alta estabilidad fotoquímica.<sup>32,33</sup> La Zn (II) Ftalocianina (ZnPc) es una Pc muy conocida y varios informes han demostrado sus propiedades como PS para TFD.<sup>21,33</sup>

## 5.2 Objetivos

El objetivo de este capítulo fue “Evaluar la actividad *in vitro* de Zn-ftalocianinas como fotosensibilizadores para Terapia Fotodinámica en células de glioblastoma”.

Para cumplir con el objetivo general se propusieron como objetivos específicos:

- Evaluar la muerte celular de células de glioblastoma T98G posterior a la TFD con Zn ftalocianinas.
- Evaluar cómo afecta la actividad fotodinámica el agregado de grupos aminos periféricos.
- Determinar la localización subcelular de ambas Pcs, la capacidad clonogénica de las células sobrevivientes post TFD y el tipo de muerte celular desencadenado en células T98G.
- Evaluar la muerte celular en otras líneas celulares de glioblastoma.

## 5.3 Resultados y discusión

### 5.3.1 Fotosensibilizadores

Para la realización de los ensayos *in vitro* en células de glioblastoma se utilizaron dos Pcs, TAZnPc que presenta 4 grupos amino en la periferia y ZnPc (Figura 2).

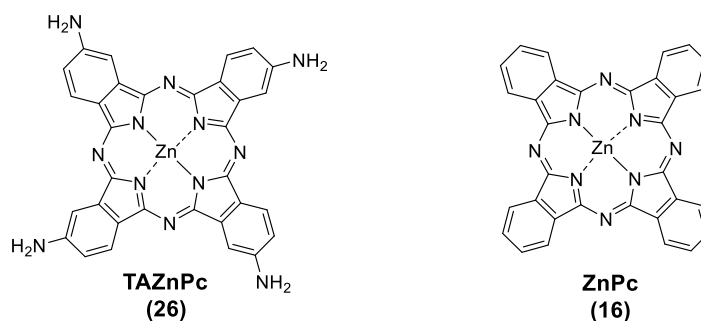


Figura 2. Estructura de las ftalocianinas utilizadas para los estudios *in vitro* en células de glioblastoma.

La penetración de la luz en los tejidos vivos depende de varios parámetros: la longitud de onda utilizada, intensidad, polarización y coherencia de la fuente de luz, composición e hidratación del tejido. Se sabe que algunos PSs que se excitan a longitudes de onda más altas tienen el potencial de aumentar la profundidad del tratamiento de los tumores.<sup>34</sup> TAZnPc muestra un desplazamiento hacia  $\lambda_{\max}$  más altas (702 nm) en los espectros de absorción en comparación con ZnPc (670nm), lo que permitiría el uso de luz de una longitud de onda mayor en la TFD, que penetre profundamente en el tejido.<sup>19,23,30,31</sup>

### 5.3.2 Citotoxicidad en oscuridad de los fotosensibilizadores

Los estudios *in vitro* en células de glioblastoma se realizaron en colaboración con el Dr. Cesar Prucca del grupo de investigación de la Dra. Beatriz Caputto del CIQUIBIC – FCQ.

En TFD los PSs deben generar muerte celular una vez irradiados, es decir, no deben ser citotóxicos en oscuridad. A fin de evaluar si las Pcs utilizadas afectan la viabilidad celular en ausencia de irradiación, se determinó el efecto de la adición de Pcs a los cultivos celulares de glioma en oscuridad. Las células se incubaron durante 18 horas con diferentes concentraciones de Pc (en el rango de 0 a 20  $\mu\text{M}$ ) disueltas en medio de cultivo y se determinó la viabilidad celular. Los resultados presentados en la Figura 3 muestran que, en ausencia de luz, ambas Pcs no son tóxicas en concentraciones menores o iguales a 0,5  $\mu\text{M}$ , siendo la fracción de supervivencia superior al 90% en comparación con las células de

control cultivadas en ausencia de Pc. Las concentraciones más altas de fotosensibilizador conducen a una reducción en la viabilidad celular, mostrando fracciones de supervivencia inferiores al 90%.

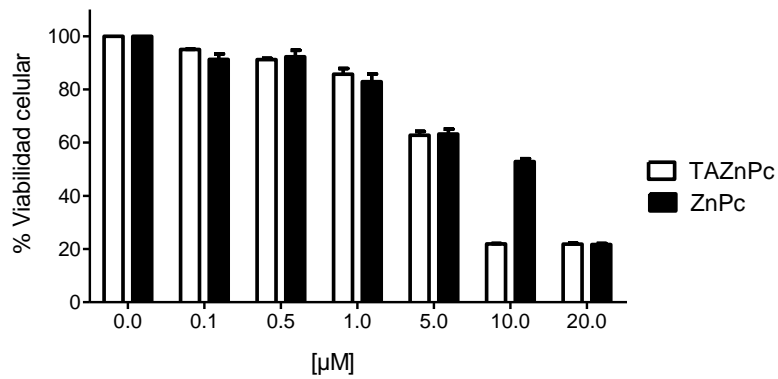


Figura 3. Citotoxicidad en oscuridad de las Pcs en células T98G.

En base a estos resultados, todos los experimentos siguientes se realizaron utilizando concentraciones de Pc  $\leq 0,5 \mu\text{M}$ .

### 5.3.3 Incorporación intracelular de Pcs

La cantidad de PS que ingresa a las células es crucial para una TFD efectiva, y depende, entre varios factores, del tiempo de contacto de las células con el PS.<sup>35</sup> Para evaluar el tiempo óptimo en el que la mayor cantidad de ftalocianina ingresa a la célula, se incubaron células T98G durante distintos tiempos en presencia de cada Pc ( $0,5 \mu\text{M}$ ) y se evaluó la cantidad relativa incorporada en las células mediante dos metodologías diferentes: citometría de flujo (Figura 4a) y por medición directa de la fluorescencia en extractos de células T98G (Figura 4b).

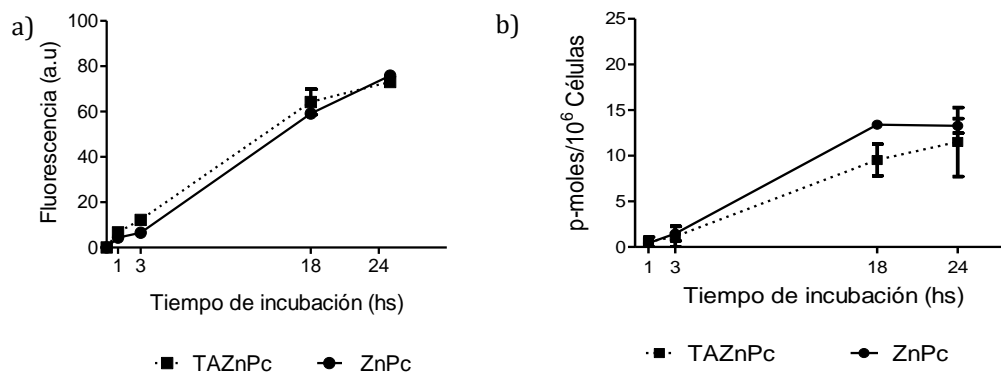


Figura 4. Incorporación intracelular de Pcs en el tiempo, determinada por a) Citometría de flujo, b) Fluorescencia

Como puede observarse en la Figura 4 a y b, hay un máximo a las 18 horas con cambios no significativos a las 24 horas (menos del 10%). Los resultados sugieren que tanto ZnPc como TAZnPc se incorporan a las células de glioblastoma T98G de forma dependiente del tiempo.

### 5.3.4 Localización subcelular.

Una vez determinado que la Pc ingresa a la célula, la acumulación y localización subcelular de los PSs es crítica para evaluar la potencialidad de la TFD, ya que el oxígeno singlete generado después de la iluminación presenta una vida útil corta y una distancia de migración de aproximadamente  $1 \mu\text{m}$ .<sup>36</sup> Por ello, se examinó la localización subcelular de TAZnPc y ZnPc mediante microscopía confocal utilizando sondas específicas de organelas. En la Figura 5a se muestran las imágenes tomadas mediante microscopía de fluorescencia de células T98G incubadas con ambas Pcs en conjunción con sondas fluorescentes para lisosomas o mitocondrias.

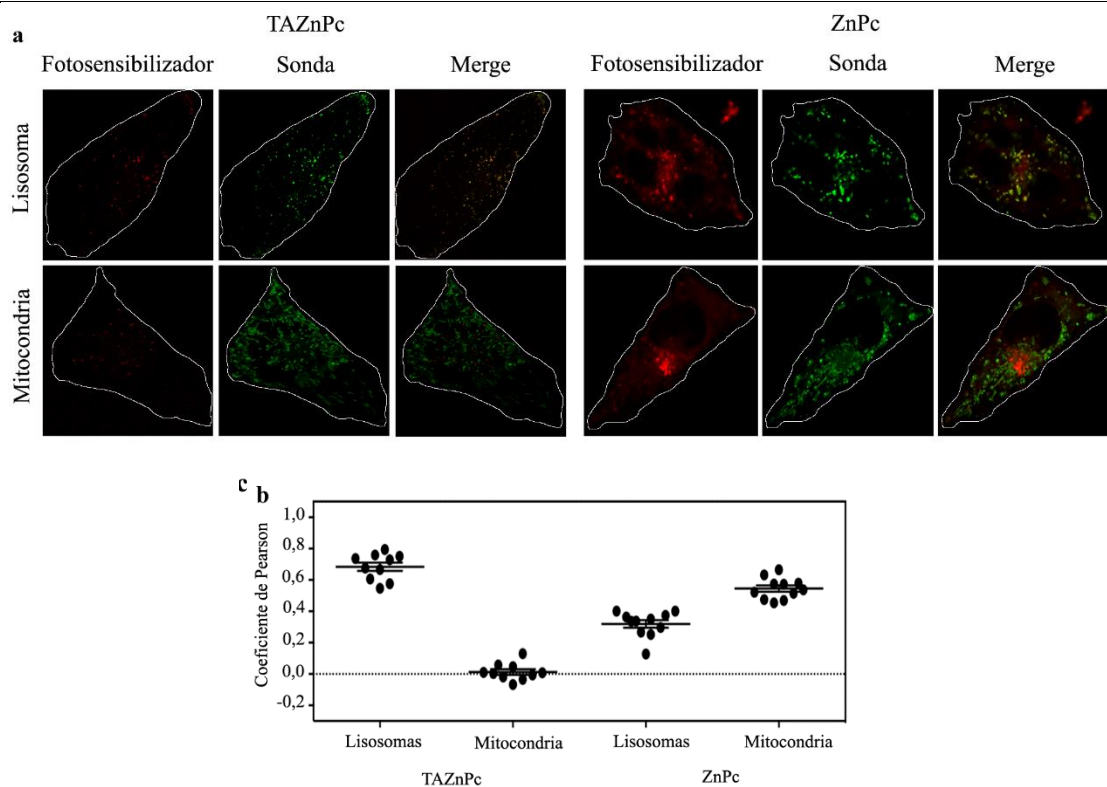


Figura 5. Localización subcelular de las Pcs en células T98G. a) Imágenes obtenidas con Microscopia confocal, b) Gráfica de los coeficientes de correlación de Pearson entre la fluorescencia de las sondas y las Pcs.

Para cada Pc, la primera columna muestra la emisión del PS (fluorescencia en rojo); la segunda columna, la emisión de la sonda de la organela (fluorescencia verde); y la tercera, (Merge, se observa fluorescencia amarilla) la superposición de ambas fluorescencias, en donde se ve co-localización, es decir, donde coincide en el mismo sitio la fluorescencia de la sonda con la correspondiente Pc. En la Figura 5b se muestran en una gráfica, los valores obtenidos por el coeficiente de correlación de Pearson, en donde se correlaciona la señal de fluorescencia de la sonda de cada organela con la correspondiente a las Pcs.

Como se puede observar en la Figura 5, TAZnPc y ZnPc se acumulan tanto en el citoplasma como en la región perinuclear. No se observó fluorescencia de Pcs en el núcleo. La co-localización de la señal PS con las sondas de organelas, muestra que TAZnPc se acumula en lisosomas, mientras que la ZnPc se acumula tanto en mitocondrias como en lisosomas. Estas observaciones se corresponden con resultados similares reportados previamente para ZnPc en otras líneas celulares.<sup>37,38,39</sup>

### 5.3.5 Fotocitotoxicidad.

La fotocitotoxicidad de las diferentes Pcs en las células T98G se evaluó utilizando tres concentraciones de Pc diferentes: 0,125, 0,25 y 0,5  $\mu\text{M}$ , el tiempo de incubación previo a la irradiación de las células fue de 18 horas. Las células se irradiaron utilizando dos dosis de luz: 10 o 27  $\text{J}/\text{cm}^2$  y la viabilidad se determinó 24 horas posteriores a la irradiación. Los gráficos de citotoxicidad de TAZnPc y ZnPc se muestran en la Figura 6a y b respectivamente.

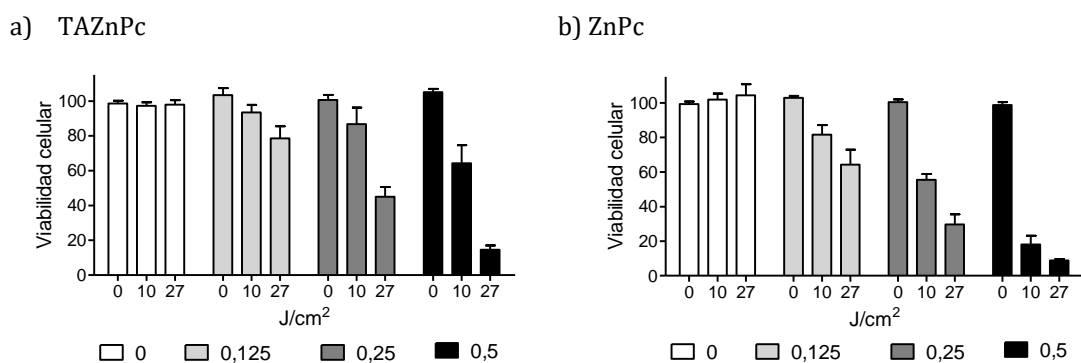


Figura 6. Efecto de las Pcs en la viabilidad celular de T98G post irradiación. Los gráficos corresponden a células tratadas con: a) TAZnPc y b) ZnPc

Los resultados muestran que ambas Pcs fueron inocuas en ausencia de luz (0  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) a las concentraciones de Pc probadas, con una fracción de supervivencia superior al 90%. Como puede observarse, hay un claro efecto citotóxico en las células expuestas a la

combinación de luz y TAZnPc o ZnPc (Figura 6 a y b, respectivamente). Además, ninguna de las dosis de luz reduce la viabilidad celular en ausencia de Pc, lo que indica que no hubo un efecto térmico detectable por la presencia de la luz durante la irradiación de las células. Como se puede observar, se logra una reducción de  $\sim 90\%$  en la supervivencia celular utilizando ZnPc o TAZnPc a  $0,5 \mu\text{M}$  combinados con una dosis de luz de  $27 \text{ J/cm}^2$ ; mientras que, cuando se usó una dosis de luz menor ( $10 \text{ J/cm}^2$ ) ZnPc redujo la viabilidad celular en aproximadamente un  $80\%$ . Sin embargo, TAZnPc fue menos eficaz para fotoinactivar células T98G mostrando una reducción de aproximadamente un  $45\%$  en la viabilidad celular. Estos resultados muestran una clara relación entre la concentración de las Pcs y la dosis de luz suministrada en los efectos citotóxicos de ambos PSs.

Esta diferencia en la efectividad de las Pcs cuando las células fueron irradiadas utilizando una dosis de  $10 \text{ J/cm}^2$  podría explicarse en parte, por la diferencia en los rendimientos cuánticos de oxígeno singlete ( $\Phi\Delta$ ) de ambos PS, en donde TAZnPc presenta una menor producción de  $^1\text{O}_2$  comparado al observado para ZnPc,  $0,49$  y  $0,56$ , respectivamente, de acuerdo a las determinaciones experimentales que se detallan en el capítulo 3.

### 5.3.6 Ensayos clonogénicos.

Se sabe que los tumores cerebrales, especialmente los glioblastomas, presentan una mayor recurrencia después de la cirugía, ya que la eliminación completa resulta difícil debido a que los límites tumorales son difusos y, en consecuencia, las células tumorales restantes permiten el crecimiento de tumores después del tratamiento inicial.<sup>40</sup> En línea con esta observación, se evaluó la capacidad clonogénica de las células T98G después de la TFD. Para ello, se realizaron los experimentos de citotoxicidad, las células se lavaron, contaron y se sembraron en placas nuevamente. Luego 8-10 días de incubación, se evaluó la formación de colonias (evidencia directa de la capacidad de las células de dividirse) y se determinó la fracción de supervivencia para cada tratamiento.

La figura 7a muestra las imágenes de los pocillos en donde se colocaron las células después del tratamiento de TFD y se evaluó la capacidad de proliferación. La Figura 7b muestra la gráfica de la cuantificación de las células que tuvieron capacidad proliferativa.

Como se puede ver en la Figura 7a y b, no se observaron colonias en células tratadas con ZnPc combinadas con ambas dosis de luz. Estos resultados indican que las células tratadas con ZnPc no retienen la capacidad de proliferación después de la TFD utilizando



cualquiera de las dosis de luz. En el caso de las células incubadas con TAZnPc, la aplicación de la dosis de luz más alta (27J/cm<sup>2</sup>) elimina completamente la capacidad de formación de colonias luego del tratamiento. Sin embargo, se observó que la combinación de TAZnPc con 10 J/cm<sup>2</sup> no reduce completamente la capacidad clonogénica de las células post-tratamiento, contrastando con lo que se observó luego de irradiar las células con una dosis de 27 J/cm<sup>2</sup>. Estas observaciones están en concordancia con los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad detallados más arriba.

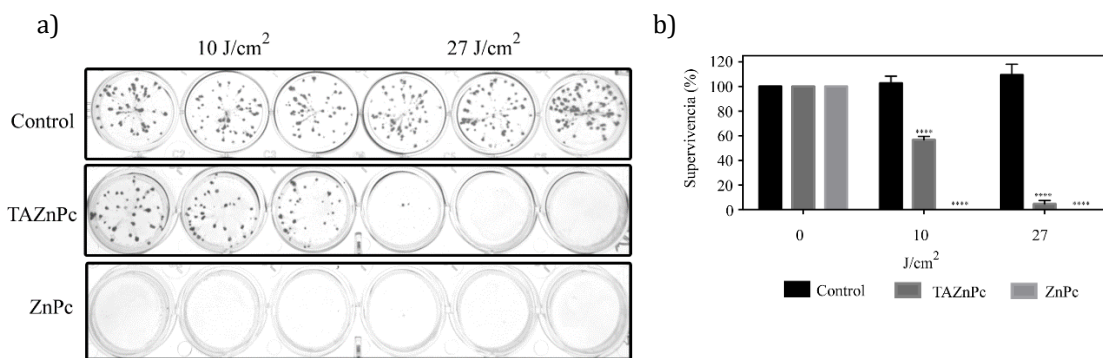


Figura 7. Ensayos clonogénicos. a) Imágenes de los pocillos utilizados en el ensayo. b) Gráfica de cuantificación de la proliferación celular.

### 5.3.7 Modo de muerte celular desencadenado por terapia fotodinámica.

A diferencia de la necrosis, la muerte celular por la vía apoptótica constituye el resultado más deseable del tratamiento antitumoral, ya que representa el mecanismo fisiológico de muerte celular y no desencadena inflamación o respuesta inmune.<sup>41</sup> Dado que se ha informado previamente que el tratamiento con TFD de células tumorales *in vitro* o *in vivo* puede inducir la muerte celular por diferentes mecanismos,<sup>25</sup> se evaluó la vía de la muerte celular desencadenada tras el tratamiento de las células con la combinación de Pc más luz.

Las caspasas son proteasas que se activan en procesos apoptóticos. En su forma inactiva, se encuentran como sus precursores, las procaspasas, que luego de recibir una señal apoptótica, sufren una fragmentación (clivaje) y dan lugar a dos subunidades que constituyen la enzima activa.<sup>42,43</sup>

Para determinar si es apoptosis la vía por la cual se indujo a la muerte en células T98G utilizando las diferentes Pcs, se utilizó el anticuerpo anti-caspasa 3 clivada (CC3). Las células

apoptóticas son reconocidas por este anticuerpo y muestran una tinción de fluorescencia roja en presencia de caspasa 3 activa. Caspasa 3 constituye un marcador directo de la activación de la vía apoptótica.

En la Figura 8 se puede observar la señal de fluorescencia roja resultante de la interacción entre el anticuerpo y la caspasa 3 clivada (activa), lo que indica que se han disparado señales de muerte celular por apoptosis. Los controles tanto en ausencia de Pc y en presencia de Pcs sin irradiación, no presentan tinción roja, lo que indica que no hay procesos apoptóticos en las células control. Para TAZnPc a  $10\text{ J/cm}^2$  se observan unas pocas células que expresan caspasa 3 clivada, pero a  $27\text{ J/cm}^2$  se observa un mayor número de células con fluorescencia roja indicando actividad de caspasa 3 clivada y, por consiguiente, apoptosis. Para ZnPc al menor tiempo de irradiación se evidenciaron señales de activación de caspasa 3. En muestras de células incubadas con ZnPc e irradiadas  $27\text{ J/cm}^2$  no se observa señal considerable para caspasa 3 activa debido tal vez a que las células que hayan disparado el mecanismo de muerte por apoptosis, se despegaron y no pudieron ser detectadas por el ensayo.

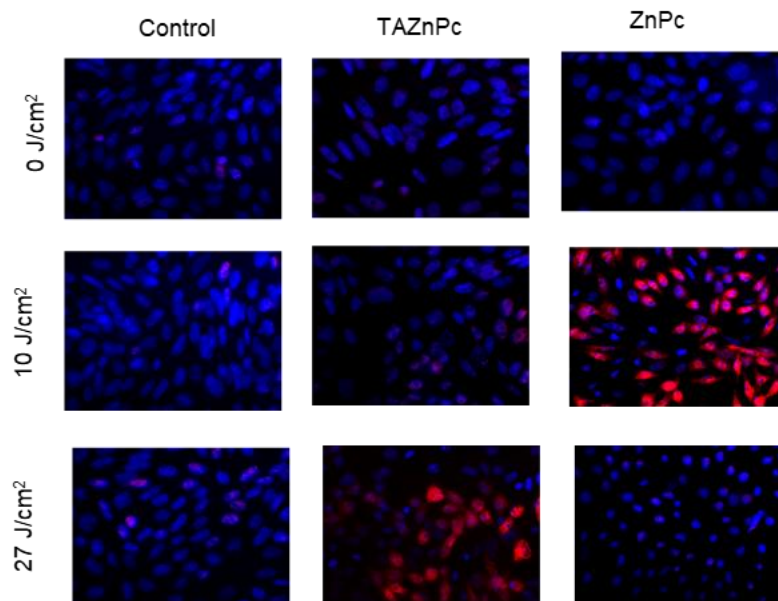


Figura 8. Microscopía de inmunodetección por fluorescencia de Caspasa 3 activa (rojo). Los núcleos de las células fueron teñidos usando DAPI (azul).

La apoptosis como mecanismo de muerte celular puede evidenciarse por otros marcadores además de la detección de caspasa activa. Los cambios en la membrana plasmática de las células en procesos de muerte celular pueden ser detectados y dar un

indicio del tipo de muerte celular que tiene lugar. El Ioduro de propidio (PI) es ampliamente utilizado en conjunción con la Anexina V para determinar si las células son viables, apoptóticas o necróticas a través de diferencias en la integridad y permeabilidad de la membrana plasmática. La fosfatidilserina es un fosfolípido que en células viables se mantiene en la monocapa interior de la membrana celular. En las primeras etapas de la muerte celular mediada por apoptosis, la fosfatidilserina migra a la capa externa de dicha membrana. La Anexina V se une específicamente a la fosfatidilserina, por lo que esta última puede ser detectada por fluorescencia siempre que Anexina V se marca con un fluoróforo. El PI, es un marcador fluorescente que se intercala en los ácidos nucleicos del ADN, el mismo no es capaz de marcar células apoptóticas en etapas tempranas ya que las mismas presentan la membrana intacta. El PI atraviesa la membrana plasmática de células que están en procesos de apoptosis tardía o necrosis donde hay un aumento de la permeabilidad. Tanto la Anexina V como el PI se pueden detectar mediante citometría de flujo. En la Figura 9, en el diagrama de puntos (*dot plot*) se muestra la ausencia o presencia de PI o anexina V dependiendo del estadio de la célula. Aquellas que no expresen ningún marcador se encuentran vivas (cuadrante inferior izquierdo); las que expresen anexina, pero no PI son células apoptóticas tempranas (cuadrante superior izquierdo). Las células que expresen PI y anexina son células en apoptosis tardías (cuadrante superior derecho) y aquellas que solo presentan señal para PI se corresponden con células en necrosis (cuadrante inferior derecho).

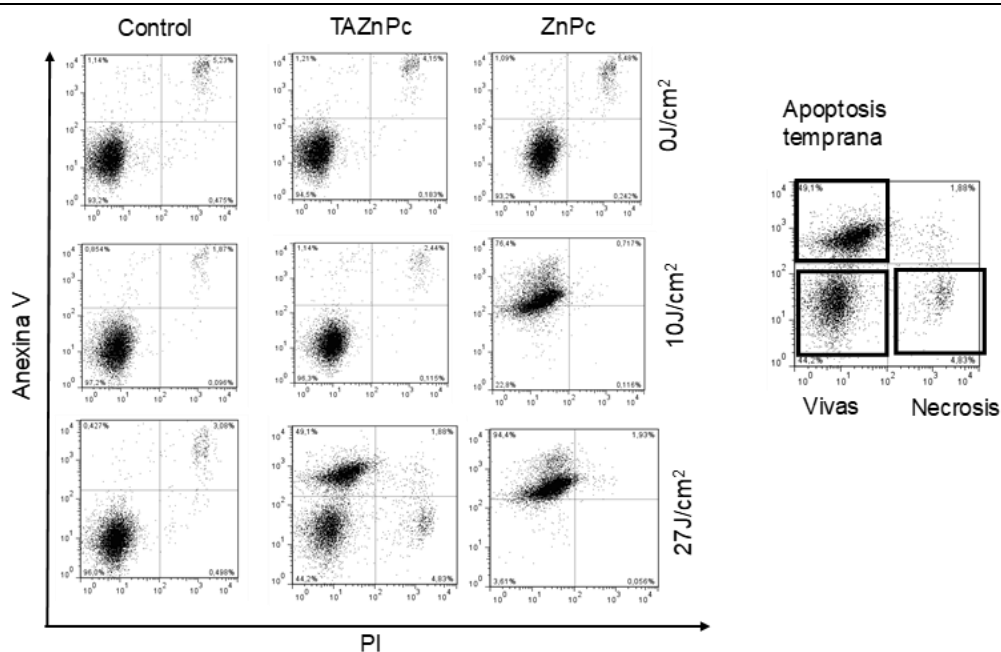


Figura 9. Diagrama de puntos de la detección de apoptosis mediante tinción con ioduro de propidio (PI) y anexina V.

Como se muestra en la Figura 9, se observó una externalización de fosfatidilserina después de la irradiación utilizando una dosis de luz de 10 o 27 J/cm<sup>2</sup> en células tratadas con ZnPc. Sin embargo, en el caso de TAZnPc, se observó una población significativa de células positivas para Anexina V solo después de la irradiación con 27 J/cm<sup>2</sup>. Se evidenció una población celular no significativa en necrosis en los tratamientos con ambas Pcs, lo que sugiere que la vía apoptótica es el mecanismo de muerte celular preferencial desencadenado después de la irradiación de las células. Estos resultados son concordantes con los observados en los ensayos de fototoxicidad, clonogenicidad luego de irradiación, como así también con lo observado en el ensayo de activación de caspasa 3.

### 5.3.8 Fotocitotoxicidad en otras células de glioma.

La fotocitotoxicidad de las dos Pcs se evaluó en tres líneas celulares de glioma adicionales (MO59, LN229 y U-87MG). Al igual que en las células T98G, se evaluó la toxicidad en oscuridad de las Pcs en las tres líneas celulares, ver Figura 10. Los resultados muestran que a concentraciones de 0,5 μM o menores, las Pcs no resultaron citotóxicas en ausencia de irradiación, resultados comparables a los informados anteriormente para las células T98G.

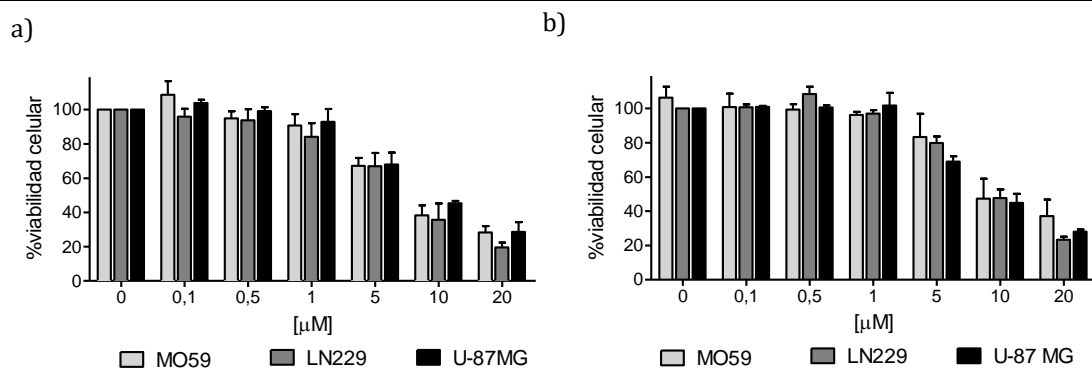


Figura 10. Citotoxicidad en oscuridad en líneas celulares de glioblastoma MO59, LN229 y U-87MG de a) TAZnPc y b) ZnPc

Con el objetivo de evaluar la citotoxicidad en otras líneas celulares se ensayó la concentración de 0,5 μM siguiendo el protocolo TFD descrito anteriormente para las células T98G. En la Figura 11 se muestran los gráficos de citotoxicidad en las tres líneas celulares para las dos Pcs evaluadas.

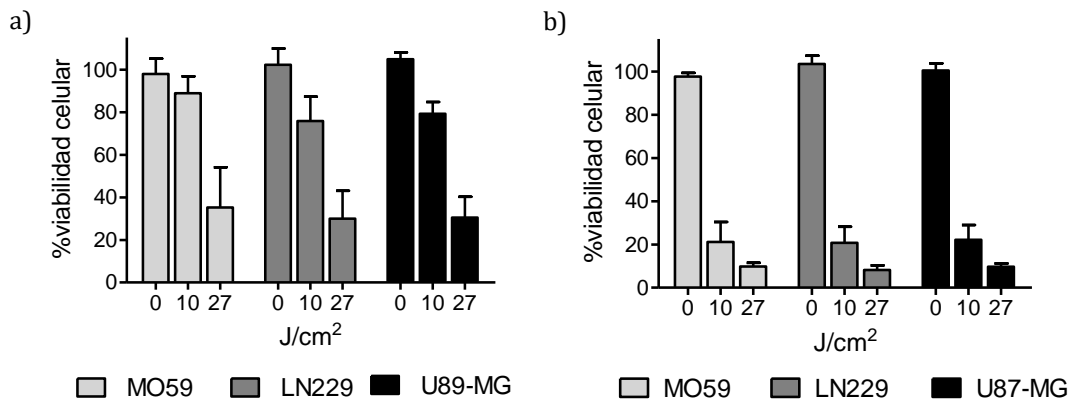


Figura 11. Efectos sobre la viabilidad celular en líneas celulares de glioblastoma MO59, LN229 y U-87MG con 0,5 µM de a) TAZnPc y b) ZnPc

De manera similar a los resultados obtenidos para las células T98G, tanto TAZnPc como ZnPc pueden desencadenar una reducción en la viabilidad celular cuando las muestras son irradiadas (Figura 11a y b, respectivamente). En las tres líneas celulares analizadas, las Pcs a concentraciones menores o iguales a 0,5 µM no resultaron tóxicas en ausencia de irradiación (fracción de supervivencia superior al 90%). La ZnPc a 0,5 µM combinado con una dosis de luz de 27 J/cm² (30 min de irradiación) redujo el 90% de la viabilidad celular en todas las líneas celulares evaluadas. En el caso de TAZnPc, solo se observó ~ 70% de reducción en las tres líneas celulares cuando se aplicó la dosis de luz más alta. Frente a la dosis de luz más baja (10 J/cm², 11 min de irradiación), ZnPc presentó resultados similares en todas las líneas celulares logrando una reducción de ~ 80% en la viabilidad celular. Por el contrario, TAZnPc fue menos efectiva para fotoinactivar células, observándose aproximadamente un 20% de reducción en la viabilidad celular frente a las líneas celulares examinadas. Estos resultados fueron similares a los observados en células T98G y muestran una clara correlación entre la dosis de luz administrada y la capacidad de fotoinactivación de ambas Pc sobre las tres líneas celulares.

La capacidad de ambas Pcs para fotoinactivar células de glioma (T98G, MO59, LN229 y U87-MG) destaca la potencialidad de estos dos compuestos para la TFD en tumores cerebrales.

## 5.4 Conclusiones

Las Pcs se consideran excelentes candidatos para ser utilizados como PS en el tratamiento con TFD de diferentes tipos de tumores. Se evaluó la efectividad de dos Pcs para

inactivar células de glioblastoma *in vitro*. ZnPc y TAZnPc se incorporan a las células y, en combinación con la luz, pueden desencadenar la muerte celular de aproximadamente el 90% de las células, principalmente por apoptosis cuando se irradian con dosis de luz de 10 y 27 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente.

Los ensayos clonogénicos determinaron que ZnPc con ambas dosis de luz, eliminó la capacidad de proliferación después de los ensayos de TFD. En cambio, TAZnPc eliminó la capacidad de proliferación celular a dosis de 27 J/cm<sup>2</sup>.

El mecanismo de muerte celular (apoptosis) se determinó por la presencia de caspasa 3 clivada (activa) y por marcadores tempranos de la apoptosis como la externalización de fosfatidilserina. Las pruebas de citotoxicidad en otras líneas celulares arrojaron valores similares a los obtenidos con T98G, destaca la potencialidad del uso de estos dos compuestos en TFD para tumores cerebrales.

El desarrollo de nuevos PS modificados para el tratamiento de tumores cerebrales será de ayuda para controlar esta enfermedad devastadora y promover la TFD como una terapia adyuvante.

## 5.5 Sección experimental

### 5.5.1 Fotosensibilizadores

La síntesis y caracterización de las ftalocianinas se desarrolló en el capítulo 2. Las soluciones que se utilizaron para los ensayos *in vitro* se realizaron en DMF. Las determinaciones de rendimientos cuánticos de oxígeno singlete se realizaron tal como se detalla en el capítulo 3, utilizando el método indirecto con 9,10-dimetilantraceno.

### 5.5.2 Fuente de luz

La irradiación se realizó usando una lámpara halógena de cuarzo de 150 W / 21 V el espectro de la lámpara se muestra en la Figura 13 de la sección 4.5.2 del Capítulo 4. La luz se filtró a través de una cubeta de acrílico de 2,5 cm llena de agua ubicada a 5 cm de la lámpara con la finalidad de absorber el calor. La muestra a irradiar se ubicó a 15,0 cm de lámpara. Las dosis de luz de 10 y 27 J/cm<sup>2</sup> corresponden a 11 y 30 min de irradiación respectivamente. La dosis de luz se determinó utilizando un medidor de luz digital SE-9087 (Extech Instruments).

### 5.5.3 Condiciones de cultivo celular

Las líneas celulares de glioma T98G, M059, LN229 y U87-MG (ATCC American Type Culture Collection) se cultivaron en DMEM (por sus siglas en inglés dulbecco modified Eagles minimal essential medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y penicilina / estreptomina como antibiótico (Gibco) en 37°C en una incubadora humidificada con 5% de atmósfera de dióxido de carbono.

### 5.5.4 Determinación de viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó usando el reactivo de viabilidad celular alamarBlue (Invitrogen) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Las células se incubaron con el reactivo alamarBlue (10 µL) disuelto en 90 µL de DMEM suplementado con 10% de SFB (volumen final: 100 µL en 96 placas de pocillos múltiples), durante 4 horas a 37°C. Las mediciones de fluorescencia se realizaron usando un lector de microplacas Biotek con una longitud de onda de excitación de 540-570 nm y las lecturas de emisión de fluorescencia a 580-610 nm.

### 5.5.5 Localización subcelular de PS

Se sembraron células T98G sobre cubreobjetos y se cultivaron durante toda la noche como se describe en condiciones de cultivo celular. Se añadió Pc a una concentración final de 0,5  $\mu\text{M}$  diluido en DMEM suplementado con 4% de SFB y antibióticos, y se incubó durante 18 horas. Luego, el medio se desechó, las células se lavaron dos veces usando buffer fosfato salino (PBS) 1X y se incubaron con sondas específicas de organelas: LysoTracker Green (lisosomas) y MitoTracker Green (mitocondrias) siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Después de la incubación, se desechó el medio, se agregó nuevamente y luego se observaron las células *in vivo* bajo microscopía confocal. La fluorescencia del sensibilizador se evaluó usando un microscopio confocal Olympus FV1200 utilizando los siguientes ajustes: Excitación a 635 nm y emisión evaluada a 660–720 nm para ZnPc y 700–730 nm para TAZnPc. La fluorescencia de la sonda específica de orgánulo se monitorizó utilizando las configuraciones recomendadas por el fabricante. El análisis de imagen y el coeficiente de correlación de Pearson calculado se realizó con el software ImageJ.

### 5.5.6 Incorporación intracelular de Pcs

La incorporación celular se determinó mediante dos métodos, medición directa de fluorescencia<sup>44</sup> y citometría de flujo.<sup>45,46</sup> Las células T98G se sembraron en una placa de 24 pocillos (75000 células/pocillo) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Las diferentes Pcs se agregaron a las células a una concentración de 0,5  $\mu\text{M}$  y se incubaron durante los tiempos descritos más arriba en ausencia de luz. Se retiró el medio, las células se lavaron dos veces con 500  $\mu\text{l}$  de PBS, se contaron y se lisaron usando 500  $\mu\text{l}$  de SDS 2% durante 1 h. La concentración de Pc se determinó por dilución de 300  $\mu\text{L}$  de lisado celular con 200  $\mu\text{L}$  de DMF y midiendo la fluorescencia de las muestras (ZnPc:  $\lambda_{\text{ex}}$ : 640 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 675 nm, TAZnPc  $\lambda_{\text{ex}}$ : 670 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 711 nm) utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia Eclipse Cary de Agilent. Las curvas de calibración se prepararon por dilución de la solución madre de Pc en DMF a la concentración deseada en lisado celular (300  $\mu\text{L}$ ) diluido en DMF (200  $\mu\text{L}$ ).

Para la citometría de flujo, las células se tripsinizaron, centrifugaron y resuspendieron en PBS 1X. La fluorescencia de la Pc se determinó usando los siguientes ajustes instrumentales: excitación a 633 nm y emisión adquirida usando un filtro de paso largo (780  $\pm$  60 nm) en un citómetro Becton Dickinson FACSCanto II. Los resultados se expresan como la media de la fluorescencia  $\pm$  DS respecto al control.



### 5.5.7 Citotoxicidad en oscuridad

Para evaluar la citotoxicidad de las Pcs en ausencia de irradiación, se sembraron células T98G en placas de 96 pocillos (7000 células/pocillo) y se incubaron durante 24 horas en DMEM suplementado con 10% de SFB más antibióticos. Luego, se reemplazó el medio y las células se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de Pcs disueltas en DMEM suplementado con 4% de SFB más antibióticos. Después de 18 horas de incubación, se desechó el medio y se determinó la viabilidad usando alamarBlue (Invitrogen) como se describió anteriormente.

### 5.5.8 Fotocitotoxicidad

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 7000 células / pocillo y se cultivaron durante la noche a 37°C en DMEM suplementado con 10% de SFB más antibióticos. El medio se reemplazó con DMEM suplementado con 4% de SFB conteniendo el fotosensibilizador a la concentración deseada y las células se incubaron durante 18 horas a 37°C. Luego, el medio de cultivo fue reemplazado por medio DMEM suplementado con SFB al 10% y las células se irradiaron aplicando la dosis de luz deseada (10 o 27 J/cm<sup>2</sup>). La dosis de luz se determinó utilizando un medidor de luz digital SE-9087 (Extech Instruments). La viabilidad se examinó 24 horas después de la iluminación usando alamarBlue (Invitrogen) como se describió anteriormente y se expresó referida a las células de control (células no irradiadas sin Pc).

### 5.5.9 Ensayo clonogénico

Las células se trataron como se describió en el ítem 5.5.8 y 24 horas después, las células se tripsinizaron, contaron, diluyeron y colocaron en placas. Las mismas se colocaron en la incubadora durante 8-10 días adicionales. Luego, se retiraron los medios celulares y se enjuagaron las células usando PBS 1X y se tiñeron usando 500 µL de solución de fijación/tinción (0,05% cristal violeta, formaldehído al 1%, metanol al 1% en PBS 1X) durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavó con agua. Después del secado al aire, las placas se fotografiaron y contaron. La fracción de supervivencia se calculó como (número de colonias formadas/número de células sembradas × eficiencia de la placa) × 100. La eficiencia de la placa se calculó utilizando el control de células y la siguiente fórmula: PE = (número de colonias formadas / número de células sembradas). Todos los experimentos

se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se presentaron como valores medios  $\pm$  SEM.

#### 5.5.10 Inmunodetección de caspasa 3 clivada

Las células se sembraron sobre cubreobjetos en 24 placas de pocillos múltiples a una densidad de 150000 células/pocillo y se cultivaron durante toda la noche a 37°C. El tratamiento de TFD se realizó como se describió anteriormente; luego, las células se lavaron dos veces con PBS 1X frío y se fijaron usando *para*-formaldehído al 4% a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las células fijadas se permeabilizaron en PBS 1X Triton X-100 al 0,1% durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se lavaron dos veces usando PBS 1X. Los cubreobjetos se bloquearon con PBS 1X / albúmina de suero bovino (BSA) al 3% durante 2 horas a temperatura ambiente y se incubaron durante la noche a 4 ° C con anti-caspasa 3 clivada (1: 400, Cell Signaling, EE.UU.). Después del lavado, las células se incubaron con anticuerpo Alexa 546 anti-conejo (1: 1000, Molecular Probes, EE. UU.) durante 1 hora a temperatura ambiente. La tinción de los núcleos se realizó durante 10 minutos a temperatura ambiente mediante incubación con 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los cubreobjetos se montaron con FluorSave (Calbiochem, San Diego, EE. UU.) y se visualizaron bajo un microscopio confocal Olympus FV1000. La cuantificación, se realizó analizando al menos 10 microfotografías de células sometidas a cada tratamiento.

#### 5.5.11 Detección de apoptosis y necrosis: tinción de anexina V – Ioduro de propidio

La determinación del modo de muerte celular se realizó tres horas después de la TFD. Las células desprendidas se recogieron y se lavaron con PBS 1X. Las células unidas se recogieron por incubación con tripsina durante 2 min. La fosfatidilserina expuesta a la superficie celular se evaluó utilizando el conjugado Anexina-V FITC (Invitrogen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Las células se incubaron también con PI y luego se analizaron por citometría de flujo. Las células se clasificaron de la siguiente manera: células vivas (anexina V – PI –), células en apoptosis temprana (anexina V + PI –), células en apoptosis tardía (anexina V + PI +) o células en necrosis (anexina V – PI +).

## 5.6 Bibliografía

1. Schwab, M., *Encyclopedic reference of cancer*. Springer Science & Business Media: **2001**.
2. Wang, A.; Gui, L.; Lu, S.; Zhou, L.; Zhou, J.; Wei, S., Tumor microenvironment-responsive charge reversal zinc phthalocyanines based on amino acids for photodynamic therapy. *Dyes and Pigments* **2016**, *126*, 239-250.
3. Yingchoncharoen, P.; Kalinowski, D. S.; Richardson, D. R., Lipid-Based Drug Delivery Systems in Cancer Therapy: What Is Available and What Is Yet to Come. *Pharmacological reviews* **2016**, *68* (3), 701-787.
4. Wen, P. Y.; Kesari, S., Malignant Gliomas in Adults. *New England Journal of Medicine* **2008**, *359* (5), 492-507.
5. Stupp, R.; Mason, W. P.; van den Bent, M. J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M. J. B.; Belanger, K.; Brandes, A. A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; Curschmann, J.; Janzer, R. C.; Ludwin, S. K.; Gorlia, T.; Allgeier, A.; Lacombe, D.; Cairncross, J. G.; Eisenhauer, E.; Mirimanoff, R. O., Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine* **2005**, *352* (10), 987-996.
6. Wilson, T. A.; Karajannis, M. A.; Harter, D. H., Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surg Neurol Int* **2014**, *5*, 64-64.
7. Laquintana, V.; Trapani, A.; Denora, N.; Wang, F.; Gallo, J. M.; Trapani, G., New strategies to deliver anticancer drugs to brain tumors. *Expert opinion on drug delivery* **2009**, *6* (10), 1017-1032.
8. van Tellingen, O.; Yetkin-Arik, B.; de Gooijer, M. C.; Wesseling, P.; Wurdinger, T.; de Vries, H. E., Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* **2015**, *19*, 1-12.
9. Ogawa, D.; Ansari, K.; Nowicki, M. O.; Salińska, E.; Bronisz, A.; Godlewski, J., MicroRNA-451 Inhibits Migration of Glioblastoma while Making It More Susceptible to Conventional Therapy. *Non-Coding RNA* **2019**, *5* (1), 25.
10. Cheng, L.; Bao, S.; Rich, J. N., Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma. *Biochemical pharmacology* **2010**, *80* (5), 654-665.
11. Yang, C.; Jin, K.; Tong, Y.; Cho, W. C., Therapeutic potential of cancer stem cells. *Medical oncology (Northwood, London, England)* **2015**, *32* (6), 619.
12. Campos, B.; Olsen, L. R.; Urup, T.; Poulsen, H. S., A comprehensive profile of recurrent glioblastoma. *Oncogene* **2016**, *35* (45), 5819-5825.
13. Dabrowski, J. M.; Arnaut, L. G., Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **2015**, *14* (10), 1765-1780.
14. Cieplik, F.; Deng, D.; Crielaard, W.; Buchalla, W.; Hellwig, E.; Al-Ahmad, A.; Maisch, T., Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. *Critical reviews in microbiology* **2018**, *44* (5), 571-589.
15. Hamblin, M. R.; Huang, Y., *Imaging in Photodynamic Therapy*. CRC Press: 2017.
16. Wan, M. T.; Lin, J. Y., Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology* **2014**, *7*, 145-163.
17. Dolmans, D. E. J. G. J.; Fukumura, D.; Jain, R. K., Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer* **2003**, *3* (5), 380-387.
18. Ost, D., Photodynamic therapy in lung cancer. A review. *Methods Mol Med* **2003**, *75*, 507-526.

19. Yoon, I.; Li, J. Z.; Shim, Y. K., Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clinical endoscopy* **2013**, *46* (1), 7-23.
20. Robertson, C. A.; Evans, D. H.; 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), 1-8.
21. Acedo, P.; Stockert, J. C.; Canete, M.; Villanueva, A., Two combined photosensitizers: a goal for more effective photodynamic therapy of cancer. *Cell death & disease* **2014**, *5*, e1122.
22. Allison, R. R.; Moghissi, K., Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clinical endoscopy* **2013**, *46* (1), 24-29.
23. Allison, R. R.; Sibata, C. H., Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **2010**, *7* (2), 61-75.
24. Buytaert, E.; Dewaele, M.; Agostinis, P., Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et biophysica acta* **2007**, *1776* (1), 86-107.
25. Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R., Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **2005**, *2* (1), 1-23.
26. Johns, P., Chapter 8 - Cellular mechanisms of neurological disease. In *Clinical Neuroscience*, Johns, P., Ed. Churchill Livingstone: 2014; pp 91-103.
27. Perria, C.; Capuzzo, T.; Cavagnaro, G.; Datti, R.; Francaviglia, N.; Rivano, C.; Tercero, V. E., Fast attempts at the photodynamic treatment of human gliomas. *Journal of neurosurgical sciences* **1980**, *24* (3-4), 119-129.
28. Stylli, S. S.; Kaye, A. H.; MacGregor, L.; Howes, M.; Rajendra, P., Photodynamic therapy of high grade glioma - long term survival. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* **2005**, *12* (4), 389-398.
29. Akimoto, J.; Haraoka, J.; Aizawa, K., Preliminary clinical report on safety and efficacy of photodynamic therapy using talaporfin sodium for malignant gliomas. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **2012**, *9* (2), 91-99.
30. Wilson, B. C.; Jeeves, W. P.; Lowe, D. M., In vivo and post mortem measurements of the attenuation spectra of light in mammalian tissues. *Photochemistry and photobiology* **1985**, *42* (2), 153-162.
31. Szaciłowski, K.; Macyk, W.; Drzewiecka-Matuszek, A.; Brindell, M.; Stochel, G., Bioinorganic Photochemistry: Frontiers and Mechanisms. *Chemical reviews* **2005**, *105* (6), 2647-2694.
32. Bonnett, R., Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chemical Society reviews* **1995**, *24* (1), 19.
33. Chin, Y.; Lim, S. H.; Zorlu, Y.; Ahsen, V.; Kiew, L. V.; Chung, L. Y.; Dumoulin, F.; Lee, H. B., Improved Photodynamic Efficacy of Zn(II) Phthalocyanines via Glycerol Substitution. *PLoS one* **2014**, *9* (5), e97894.
34. Lee, L. K.; Whitehurst, C.; Pantelides, M. L.; Moore, J. V., In situ comparison of 665 nm and 633 nm wavelength light penetration in the human prostate gland. *Photochemistry and photobiology* **1995**, *62* (5), 882-886.
35. Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R., Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **2004**, *1* (4), 279-293.
36. Nonell, S.; Flors, C., *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences*. Royal Society of Chemistry: **2016**; Vol. 1.

37. Alexandratou, E.; Yova, D.; Loukas, S., A confocal microscopy study of the very early cellular response to oxidative stress induced by zinc phthalocyanine sensitization. *Free radical biology & medicine* **2005**, *39* (9), 1119-1127.
38. Fabris, C.; Valduga, G.; Miotto, G.; Borsetto, L.; Jori, G.; Garbisa, S.; Reddi, E., Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer research* **2001**, *61* (20), 7495-7500.
39. Vittar, N. B.; Prucca, C. G.; Strassert, C.; Awruch, J.; Rivarola, V. A., Cellular inactivation and antitumor efficacy of a new zinc phthalocyanine with potential use in photodynamic therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology* **2008**, *40* (10), 2192-2205.
40. Mallick, S.; Benson, R.; Hakim, A.; Rath, G. K., Management of glioblastoma after recurrence: A changing paradigm. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute* **2016**, *28* (4), 199-210.
41. Elmore, S., Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* **2007**, *35* (4), 495-516.
42. Kidd, V. J., PROTEOLYTIC ACTIVITIES THAT MEDIATE APOPTOSIS. *Annual Review of Physiology* **1998**, *60* (1), 533-573.
43. Cohen, G. M., Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical journal* **1997**, *326* (Pt 1), 1-16.
44. Hofman, J. W.; van Zeeland, F.; Turker, S.; Talsma, H.; Lambrechts, S. A.; Sakharov, D. V.; Hennink, W. E.; van Nostrum, C. F., Peripheral and axial substitution of phthalocyanines with solketal groups: synthesis and in vitro evaluation for photodynamic therapy. *Journal of medicinal chemistry* **2007**, *50* (7), 1485-1494.
45. Schimanski, A.; Ebbert, L.; Sabel, M. C.; Finocchiaro, G.; Lamszus, K.; Ewelt, C.; Etminan, N.; Fischer, J. C.; Sorg, R. V., Human glioblastoma stem-like cells accumulate protoporphyrin IX when subjected to exogenous 5-aminolaevulinic acid, rendering them sensitive to photodynamic treatment. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **2016**, *163*, 203-210.
46. Postigo, F.; Sagrista, M. L.; De Madariaga, M. A.; Nonell, S.; Mora, M., Photosensitization of skin fibroblasts and HeLa cells by three chlorin derivatives: Role of chemical structure and delivery vehicle. *Biochimica et biophysica acta* **2006**, *1758* (5), 583-596.



---

## Capítulo 6

---

# Fotosensibilizadores de 3<sup>o</sup> generación: Ftalocianinas vehiculizadas en liposomas. Síntesis y caracterización.

6.1	Introducción .....	131
6.2	Objetivos .....	135
6.3	Resultados y discusión.....	136
6.3.1	Fotosensibilizadores .....	136
6.3.2	Síntesis de liposomas.....	136
6.3.3	Caracterización liposomal .....	137
6.3.4	Estabilidad a corto plazo .....	140
6.3.5	Estabilidad a largo plazo .....	140
6.3.6	Localización de las Pcs en el liposoma .....	141
6.3.7	Propiedades fotofísicas en medio de cultivo .....	144
6.4	Conclusiones.....	146
6.5	Sección experimental .....	147
6.5.1	Equipamiento para espectroscopía .....	147
6.5.2	Fotosensibilizadores .....	147
6.5.3	Síntesis de liposomas.....	147

6.5.4	Caracterización de liposomas .....	147
6.5.5	Estabilidad a corto plazo .....	148
6.5.6	Estabilidad a largo plazo .....	149
6.5.7	Localización de las Pcs en los liposomas.....	149
6.5.8	Propiedades fotofísicas en medio de cultivo.....	149
6.6	Bibliografía.....	150



## 6.1 Introducción

La *primera generación* de fotosensibilizadores (PSs) fueron las porfirinas naturales y sus derivados. Estos compuestos se desarrollaron en la década del '70 y se trataba de una mezcla de compuestos que presentaron una buena actividad fotodinámica, pero luego se descubrió que presentaban desventajas tales como fototoxicidad cutánea prolongada, bandas de baja absorción en las longitudes de onda rojas y citotoxicidad en oscuridad.<sup>1</sup>

Los PSs de *segunda generación* se desarrollaron para superar las desventajas de los compuestos de primera generación, algunos ejemplos de ellos son el 5-ácidoaminolevulínico (5-ALA), derivados de benzoporfirinas y ftalocianinas (Pcs).<sup>2,3</sup> Muchos de los requisitos para que un PS sea de segunda generación son químicos: compuesto único, absorción en el visible o IR cercano con altos coeficientes de extinción molar y alto rendimiento cuántico de oxígeno singlete.<sup>2</sup> La mayoría de los PSs disponibles son compuestos con naturaleza aromática e hidrofóbica con una limitada solubilidad en agua, esto hace que se agreguen en condiciones fisiológicas reduciendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y los rendimientos cuánticos de oxígeno singlete ( $\Phi_{\Delta}$ ). En el caso de PSs solubles en agua, la selectividad de acumulación en sitios malignos no es lo suficientemente alta para uso clínico.<sup>4</sup> Por lo tanto, los estudios actuales relativos a PSs, están dirigidos a aquellos de *tercera generación* que consisten en fotosensibilizadores de segunda generación que se han modificado con agentes de direccionamiento (como la conjugación de anticuerpos) y/o la encapsulación en portadores (como liposomas, micelas y nanopartículas)<sup>5</sup> con el objetivo de mejorar la solubilidad de los PSs, así como la selectividad del tratamiento al promover el direccionamiento tumoral.<sup>4</sup>

Las ftalocianinas (Pcs), PSs de segunda generación, presentan numerosas ventajas en las aplicaciones en terapia fotodinámica (TFD) como resultado de su máxima longitud de onda de absorción ( $\lambda_{\text{máx}} > 670 \text{ nm}$ ) y sus altos coeficientes de extinción ( $\epsilon_{\text{máx}} > 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Además de su alta absorción en la ventana fototerapéutica, las Pcs presentan baja o nula absorción en el intervalo de 400 a 600 nm, donde la intensidad de la luz solar es alta. En consecuencia, se observa una disminución de los niveles de fotosensibilización de la piel causados por la luz del día, respecto a los PSs de primera generación. Además, sus estructuras químicas se modifican fácilmente mediante la introducción de metales centrales y sustituyentes axiales, periféricos y no periféricos. Estos cambios permiten variar algunas propiedades físicas y químicas, farmacocinética y biodistribución de las Pcs.<sup>6,7,8</sup>

La eficiencia de las Pcs en medios acuosos disminuye como consecuencia de su naturaleza lipofílica y su solubilidad limitada en el agua, lo que lleva a la formación de agregados.<sup>9</sup> A fin de revertir esta desventaja, las Pcs pueden modificarse por encapsulación en diferentes sistemas transportadores.<sup>10,11</sup> Los liposomas son vesículas constituidas por una o más bicapas de fosfolípidos. Contienen un compartimento acuoso en su interior que puede incorporar fármacos hidrofílicos, mientras que el centro hidrófobo de las bicapas puede receptar compuestos lipofílicos.<sup>12,13</sup> Diversos estudios han sugerido que las Pcs administradas en liposomas pueden mejorar la eficacia en TFD.<sup>14,15,16,17</sup>

Los liposomas fueron descubiertos en 1961 por Bangham y colaboradores,<sup>18</sup> quienes observaron que, cuando los fosfolípidos se dispersan en agua, espontáneamente forman una estructura cerrada con un espacio interno acuoso limitado por la membrana de la bicapa de fosfolípidos, dando origen a estructuras vesiculares altamente organizadas (ver Figura 1).<sup>18,19</sup> Los componentes estructurales de los liposomas son fosfolípidos que puede contener esteroides tales como colesterol, que impactan en la fluidez de la membrana.<sup>20</sup> Debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja toxicidad, las potenciales aplicaciones de los liposomas como portadores farmacéuticos para la mejora de la eficacia y la reducción de la toxicidad son bien reconocidas.<sup>13</sup> Debido al gran desarrollo en tecnología de liposomas, un gran número de formulaciones liposomales están disponibles para su uso y muchos productos están en etapa de ensayos clínicos, ya que la encapsulación de fármacos en liposomas mejora los índices terapéuticos de varios agentes.<sup>20</sup>

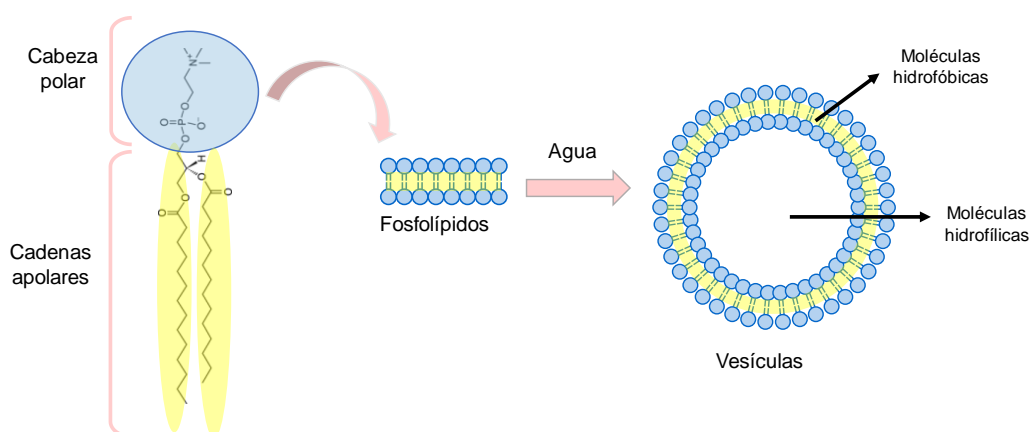


Figura 1. Estructura de fosfolípidos y formación de vesículas por contacto con medios acuosos

Algunas de las propiedades físicas como carga superficial, tamaño, permeabilidad y rigidez de la pared, o capacidad de carga se pueden modificar fácilmente debido a la amplia variedad de fosfolípidos que existen.<sup>21,22</sup> Se han informado varias técnicas en la literatura

para la preparación de liposomas: la hidratación de film, la evaporación de fase inversa, las técnicas de inyección de solventes y la diálisis con detergentes, son los métodos más comúnmente aplicados.<sup>13</sup>

En función del tamaño y número de capas, los liposomas pueden clasificarse en:

- *Vesículas unilamelares*: compuestos por una sola bicapa, con una cavidad interior acuosa. Según el tamaño pueden ser vesículas unilamelares pequeñas<sup>23</sup> (SUV) desde 40 hasta 100 nm, vesículas unilamelares grandes (LUV) cuyo tamaño puede ser de 100 a 500 nm o vesículas unilamelares gigantes (GUV) con un tamaño mayor a 1  $\mu\text{m}$  (Figura 2).<sup>19,24</sup>
- *Vesículas multilamelares*: compuestas por varias bicapas con un tamaño mayor a 1  $\mu\text{m}$ . Si las bicapas se encuentran de forma concéntrica se denominan vesículas multilamelares (MLV), y si las bicapas se disponen de manera irregular, se denominan vesículas multivesiculares (MVV) (ver Figura 2).<sup>19,24</sup>

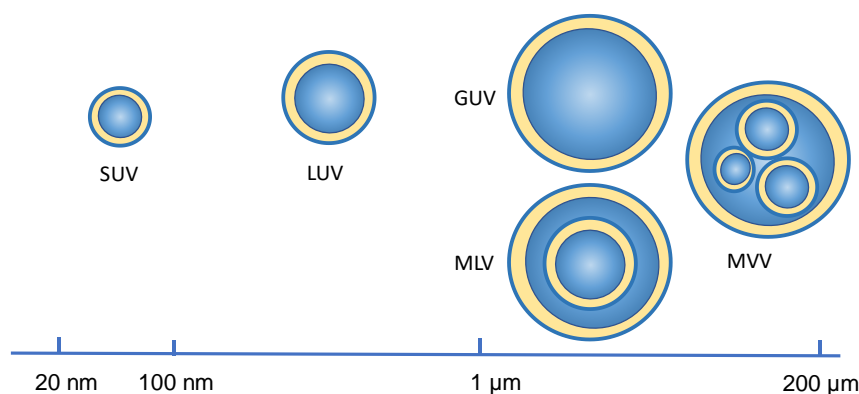


Figura 2. Clasificación de liposomas según tamaño y número de bicapas.

Los fosfolípidos son moléculas anfífilas cuya parte hidrófoba está constituida por las cadenas hidrocarbonadas de carácter neutro y el componente hidrófilo es la cabeza del fosfolípido que posee carga eléctrica, como se puede observar en la Figura 1. Los fosfolípidos, al igual que todas las moléculas de carácter anfílico pueden clasificarse según la cabeza polar como aniónicos (cabeza polar negativa), catiónicos (cabeza polar positiva), zwitteriónicos y no iónicos (cabeza polar sin carga). Es la cabeza polar del fosfolípido la que proporciona el valor de la carga al agregado formado.<sup>25</sup> La longitud y grado de insaturación (enlaces dobles existentes en las cadenas) presente en la cadena hidrocarbonada es un factor importante.<sup>26</sup> Los fosfolípidos poseen diferentes fases lipídicas cuya presencia dependerá de la estructura del lípido, del tipo de disolvente y de la temperatura de trabajo.

Desde el punto de vista del comportamiento térmico los fosfolípidos pueden encontrarse en forma gel (alta temperatura) o en forma cristalina (baja temperatura). La temperatura que marca el paso de una fase a otra se denomina temperatura de transición de fase,  $T_m$ , y es característica de cada lípido puesto que depende directamente del tamaño de las cadenas, de la presencia de insaturaciones y de la naturaleza de la cabeza polar. Así, cuanto mayor es la longitud de la cadena hidrocarbonada, mayor es la energía necesaria para realizar el cambio de fase, y por tanto la temperatura de transición es mayor.<sup>27</sup> Además la presencia de dobles enlaces, en la cadena, aumenta la dificultad de empaquetamiento y disminuye, en consecuencia, la temperatura de transición.<sup>26</sup>

Como puede observarse en la Figura 3, la bicapa puede modificarse incorporando polímeros como el polietilenglicol (PEG), ligandos o lípidos cargados, con el fin de mejorar diversos aspectos.<sup>28</sup>

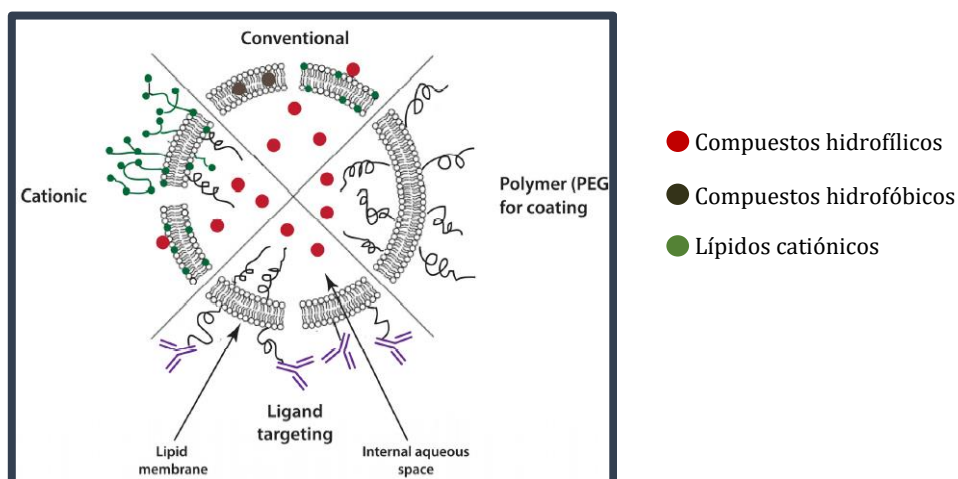


Figura 3. Representación esquemática de modificaciones en la superficie de los liposomas. Imagen extraída de Pharmaceutics 2014, 6 (1), 137-174 <sup>28</sup>

Los procesos por los cuales los liposomas y otras nanopartículas se eliminan del torrente son a través del reconocimiento y la captación por los macrófagos del sistema reticuloendotelial (SRE), que residen principalmente en el hígado y el bazo, de manera que, si son captados por el SRE rápidamente se eliminarán, y su efectividad disminuye. Los liposomas también pueden interactuar con los componentes plasmáticos, como las proteínas, lo que afecta su destino, impactando en su estabilidad y/o modulando su interacción posterior con las células diana.<sup>28</sup> La eliminación o *clearance* puede verse influenciado por diversos factores. Los liposomas más pequeños tienden a presentar semividas de circulación más largas que los liposomas más grandes, de la misma composición de membrana, y se distribuyen más rápidamente en tumores sólidos debido a

su mayor capacidad de extravasación a través de los endotelios tumorales más porosos.<sup>29</sup> En consecuencia, la bicapa puede modificarse con polímeros como el PEG en la superficie, generando liposomas estabilizados estéricamente, que prolongan el tiempo de circulación en el torrente sanguíneo ya que no son fácilmente detectados por el SRE.<sup>30</sup> El empleo de fosfolípidos de alta transición de fase (alta  $T_m$ ) como diestearoil o fosfatidilcolinas (PC), y la inclusión de colesterol (col) reducen la eliminación de los liposomas ya que disminuye la unión con las opsoninas y por lo tanto la eliminación del SRE.<sup>31</sup>

La carga superficial de los liposomas, le confiere mayor estabilidad a la formulación debido a que por repulsión de cargas no se fusionan, manteniendo el tamaño por más tiempo. La incorporación de lípidos cargados, acelera el *clearance* de liposomas en circulación.<sup>32,33</sup> Los liposomas con carga negativa comúnmente incluyen fosfolípidos aniónicos como el ácido fosfatídico, fosfatidilserina y fosfatidilglicerol. Los liposomas cargados positivamente se componen comúnmente de lípidos dialquil/diacil catiónicos como el di-oleoil-trimetilamonio-propano (DOTAP), di-octadecenil-trimetilamonio-propano (DOTMA).<sup>33</sup>

Los liposomas pueden unirse con anticuerpos u otros ligandos funcionalizados como inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulinas para formar los inmunoliposomas, lo que los convierte en sistemas que pueden acceder con mayor facilidad a determinados tejidos con el fin de mejorar la actividad y generar una acción más selectiva del fármaco incorporado a la vesícula.<sup>21,28</sup>

## 6.2 Objetivos

Los PSs de tercera generación presentan ventajas frente a los de segunda para sus aplicaciones en TFD; en este capítulo se propone como objetivo general “Sintetizar fotosensibilizadores de *tercera generación* y comparar sus propiedades con los de *segunda generación* para su posterior uso en terapia fotodinámica”.

Para lograr el objetivo principal, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Vehiculizar ftalocianinas en liposomas.
- Caracterizar los PSs de tercera generación, determinando tamaño, incorporación de Pc y estabilidad liposomal.
- Evaluar las propiedades espectroscópicas de las Pcs incorporadas en los liposomas.
- Estimar la localización de las Pcs en el liposoma.

## 6.3 Resultados y discusión

### 6.3.1 Fotosensibilizadores

En el capítulo 2 se presentó la síntesis de distintas Pcs, PSs de segunda generación, de ellas se seleccionaron las dos utilizadas en los ensayos de muerte celular (ZnPc y TAZnPc) para su incorporación en liposomas (PSs de tercera generación). En la Figura 4 se muestran las Pc que se encapsularon en liposomas. A modo de aclaración, los liposomas siempre se utilizan en un medio acuoso, *buffer* fosfato (PBS).

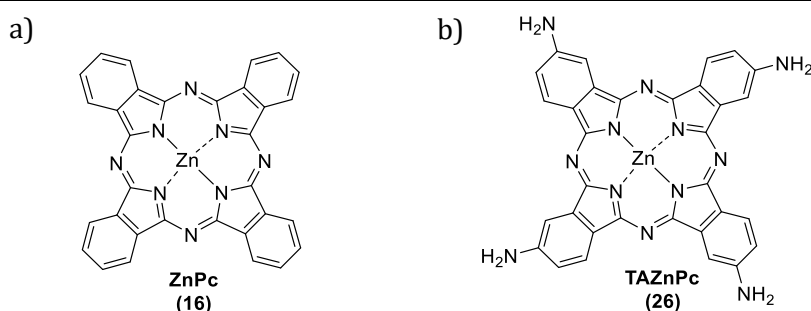


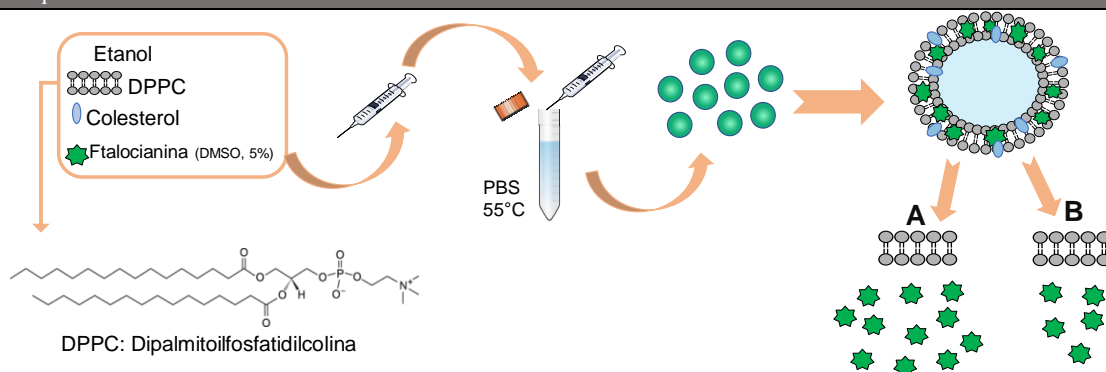
Figura 4. Estructura de las Ftalocianinas incorporadas en liposomas. a) ZnPc, b) TAZnPc.

### 6.3.2 Síntesis de liposomas

La síntesis de fotosensibilizadores de tercera generación, incorporando Pcs en liposomas, se llevó a cabo modificando la metodología de inyección ya reportada, utilizando DMSO en lugar de piridina como co-solvente.<sup>34</sup> La dosis letal media (LD<sub>50</sub>) es la cantidad de sustancia que resulta mortal para la mitad de un conjunto de animales de prueba. Al comparar la LD<sub>50</sub> intravenosa de DMSO y de piridina en ratas 5,36 g/kg<sup>35</sup> y 0,36 g/kg,<sup>36</sup> respectivamente, se puede ver que el DMSO quince veces menos tóxico que la piridina. Además, el DMSO está incorporado en el manual de excipientes farmacéuticos<sup>37</sup> y se utiliza en una serie de productos regulados para aplicaciones médicas y administración de medicamentos.<sup>38,39</sup> En EE.UU, el DMSO en solución al 50% está disponible para el tratamiento de la cistitis intersticial. Este cambio en el co-solvente podría mejorar la formulación y reducir la toxicidad atribuible al uso de piridina.

Con el fin de analizar el efecto de la relación entre Pcs y la cantidad de lípidos, se desarrollaron dos formulaciones, en las cuales se mantienen constantes las cantidades de lípidos y se varía la cantidad de Pc a incorporar (ver Esquema 1). Se denomina “A” al liposoma con mayor cantidad de Pc, y “B” al que se le incorporó menor cantidad (tener presente que la cantidad de lípidos permanece invariable).

Esquema 1.



A: Relación molar. DPPC:col:Pc → 20:6:1; B: Relación DPPC:col:Pc → 20:6:0,2

### 6.3.3 Caracterización liposomal

#### 6.3.3.1 Tamaño e índice de polidispersidad

En la síntesis de liposomas, al variar la relación entre la cantidad de lípidos y Pcs, se obtuvieron diferentes formulaciones. El tamaño promedio y el índice de polidispersidad (IP), es decir, la medida de la heterogeneidad del tamaño de la formulación liposomal, se describen en la Tabla 1. Se midieron utilizando un equipo de dispersión de luz dinámica (DLS). No se observaron cambios en el tamaño y el índice de polidispersidad en las formulaciones de ZnPc-liposomas. El tamaño medio de ZnPc<sub>A</sub> fue levemente mayor que el de ZnPc<sub>B</sub>, 133 nm y 121 nm, respectivamente. Los liposomas presentaron un tamaño similar al reportado previamente.<sup>40</sup> Sin embargo, en las formulaciones de TAZnPc-liposomas el tamaño medio aumentó, cuando la relación Pc/lípidos fue mayor, 102 nm TAZnPc<sub>B</sub> y 190 nm TAZnPc<sub>A</sub>. Esto puede deberse a que al aumentar la cantidad de Pcs a incorporar en el liposoma, se favorece la formación de agregados y el empaquetamiento de la bicapa se ve alterado. El IP fue inferior a 0,3 en todos los casos, lo que indica que el tamaño de las partículas está distribuido homogéneamente.

Tabla 1. Caracterización de liposomas. Tamaño, índice de polidispersidad y % eficiencia de encapsulación<sup>a</sup>

Liposoma	Relación Molar DPPC: col: Pc	Tamaño promedio (nm) ± SD	IP	%Eficiencia de encapsulación ± SD	Concentración final de Pc μM
Control	20:6:0	139 ± 20	0,26	--	
ZnPc <sub>A</sub>	20:6:1	133 ± 25	0,26	74% ± 2	20,6
ZnPc <sub>B</sub>	20:6:0,2	121 ± 30	0,27	75% ± 3	4,1
TAZnPc <sub>A</sub>	20:6:1	190 ± 22	0,29	74% ± 3	18,9
TAZnPc <sub>B</sub>	20:6:0,2	102 ± 18	0,27	75% ± 3	3,7

IP: Índice de Polidispersidad

<sup>a</sup> Los resultados se presentan como la media ±SD de tres experimentos independientes

### 6.3.3.2 Eficiencia de encapsulación

Las formulaciones liposomales poseen una fracción de fármaco encapsulado y otra fracción no encapsulada o libre. El desarrollo de nuevas formulaciones requiere determinar la cantidad de fármaco que se encuentra libre o encapsulado, es decir, la eficiencia de la encapsulación (EE).<sup>13</sup> Los métodos para determinar la cantidad de material encapsulado consisten en la destrucción de la bicapa y la posterior cuantificación del fármaco liberado. La EE de Pcs en liposomas se determinó mediante UV-vis como se describe en la sección de materiales y métodos. En la tabla 1 se muestra el % EE de cada formulación de ZnPc y TAZnPc. En todos los casos, los valores fueron superiores al 70%, sin observarse grandes variaciones en las diferentes formulaciones.

### 6.3.3.3 Caracterización espectroscópica

Los espectros de absorción y emisión permitieron la caracterización espectroscópica y se determinaron para cada formulación de Pc-liposoma (en PBS) y se compararon con los correspondientes a las Pc en solución de *N,N*-dimetilformamida (DMF).

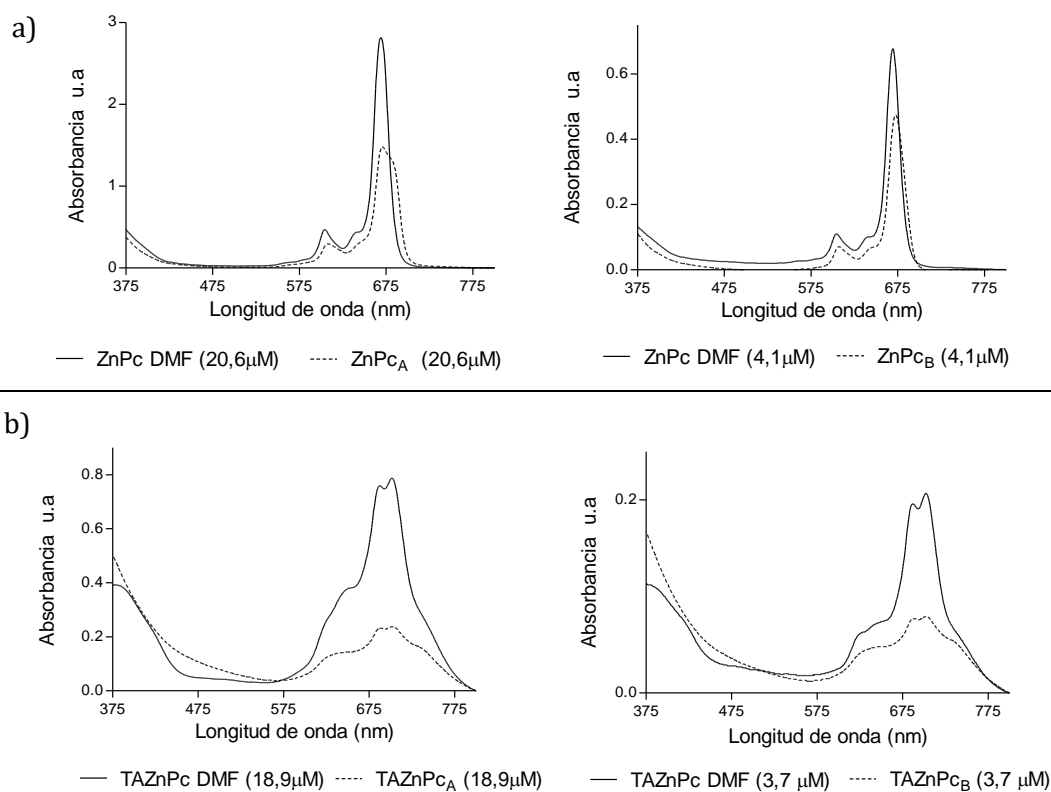


Figura 5. Espectros de absorción de Pcs en dos formulaciones liposomales y en DMF a concentraciones comparables. a) ZnPc, b) TAZnPc



Los liposomas de control no mostraron emisión de fluorescencia o absorbancia. Los espectros de absorción de las formulaciones de liposomas de ZnPc y TAZnPc no muestran cambios relevantes respecto al espectro de la Pc en solución de DMF (Figura 5 a y b, respectivamente).

A iguales concentraciones de Pc, se observó una reducción en la absorción del PS incorporado en liposomas, respecto al que se encuentra en solución con DMF, esto se relaciona con la opacidad de la formulación<sup>41</sup> y la agregación.<sup>42</sup> Las formulaciones “B” mostraron menor absorbancia que las “A” debido a la concentración final de Pc en los liposomas; además se observó agregación en las formulaciones con mayor relación Pc:liposoma (“A” respecto de “B”), es decir aquellas que tienen mayor concentración de Pc. Estos resultados son coherentes teniendo en cuenta que altas concentraciones de Pcs favorecen interacciones y en consecuencia, favorecen la agregación.<sup>43</sup>

La emisión de ZnPc y TAZnPc en liposomas respecto a la solución en DMF, muestra una disminución en la intensidad de emisión comparable a la observada en los espectros de absorción (ver Figura 6). Así mismo, las formulaciones “B”, muestran mayor intensidad de fluorescencia que las “A”.

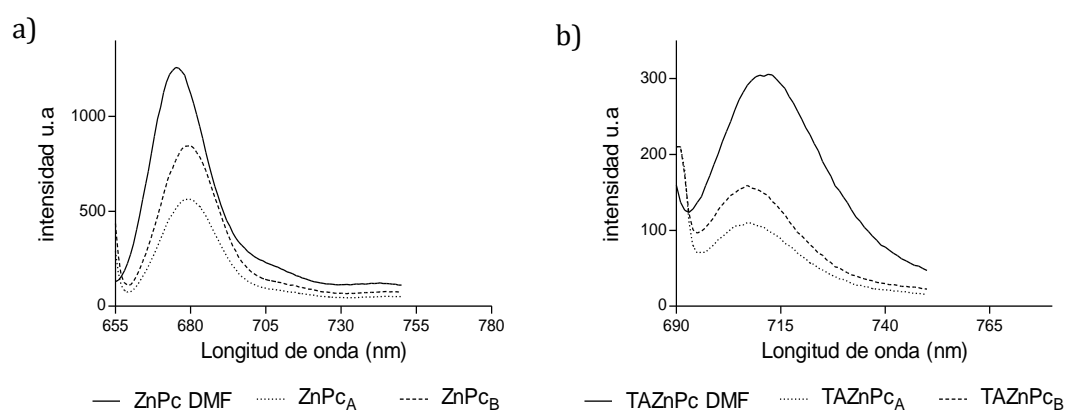


Figura 6. Espectros de emisión de Pcs en dos formulaciones liposomales y en DMF, llevados a una concentración final a 0,5 $\mu$ M. a) ZnPc  $\lambda_{exc}$  645, b) TAZnPc,  $\lambda_{exc}$  685.

Se midieron los espectros de las Pcs en PBS y no se observó ni absorción y emisión de los compuestos. Esto indica que los liposomas permiten mantener estas propiedades en un medio acuoso como PBS.

### 6.3.4 Estabilidad a corto plazo

La estabilidad de los liposomas se evaluó comparando el tamaño de partícula inicial, el índice de polidispersidad (IP), la emisión y la absorbancia con los valores obtenidos siete y quince días después de su preparación. En la tabla 2 se pueden observar los resultados obtenidos. El tamaño medio inicial de ZnPc<sub>A</sub> fue de 133 nm, después de 7 y 15 días de almacenamiento, el tamaño medio fue de 141 nm y 176 nm, respectivamente. Similar al cambio de tamaño observado para los liposomas control. Los cambios de tamaño promedio en ZnPc<sub>B</sub>, TAZnPc<sub>A</sub> y TAZnPc<sub>B</sub> presentaron el mismo comportamiento a 7 y 15 días que los observados para ZnPc<sub>A</sub>. En todas las formulaciones, 15 días después de la preparación, el tamaño de partícula fue inferior a 250 nm. Las mediciones de IP, a los 7 y 15 días, no muestran diferencias en comparación con el tamaño de partícula inicial, siendo en todos los casos  $\leq 0,3$ .

Respecto a la absorbancia y emisión de fluorescencia de las Pcs en liposomas, se determinaron 7 y 15 días posteriores a la medición inicial (después de la preparación, día 1). La emisión y la absorbancia de los liposomas de ZnPc (A y B), así como todas las formulaciones de TAZnPc, no mostraron cambios relevantes. Estos valores indican la estabilidad de las formulaciones durante 15 días.

Tabla 2. Estabilidad a corto plazo de liposomas: tamaño promedio, índice de polisipersidad, emisión y absorción medidos después de la preparación (día1), día 7 y día 15.

Liposoma	Tamaño promedio (nm) ± SD			Índice de Polidispersidad (IP)			Emisión de fluorescencia (u.a)			Absorbancia (u.a)		
	Día 1	Día 7	Día 15	Día 1	Día 7	Día 15	Día 1	Día 7	Día 15	Día 1	Día 7	Día 15
Control	139 ± 20	145 ± 25	168 ± 24	0,26± 0,02	0,28± 0,01	0,29± 0,01	—	—	—	—	—	—
ZnPc <sub>A</sub>	133 ± 25	141 ± 28	176 ± 30	0,26± 0,02	0,30± 0,02	0,29± 0,01	432	398	385	1,63	1,31	1,25
ZnPc <sub>B</sub>	121 ± 30	138 ± 35	163 ± 32	0,27± 0,01	0,28± 0,01	0,28± 0,02	650	642	631	0,48	0,39	0,36
TAZnPc <sub>A</sub>	190 ± 22	192 ± 29	241 ± 33	0,25± 0,03	0,27± 0,02	0,30± 0,03	129	125	123	0,20	0,19	0,19
TAZnPc <sub>B</sub>	102 ± 18	117 ± 22	152 ± 29	0,27± 0,01	0,29± 0,02	0,29± 0,02	314	301	298	0,11	0,11	0,10

Los resultados se presentan como la media ±SD de tres experimentos independientes

### 6.3.5 Estabilidad a largo plazo

Con el fin de evaluar la estabilidad a largo plazo, los liposomas se liofilizaron y almacenaron por 9 meses en la oscuridad y a 25°C. Para preservar la integridad de la membrana durante la liofilización, se utilizan azúcares como agentes lioprotectores,<sup>44</sup> debido a su capacidad para intercalarse en la cabeza polar de los fosfolípidos y estabilizar

las membranas.<sup>45</sup> Para la liofilización, se usó una solución de dextrosa como lioprotector. En la Tabla 3 se muestran los parámetros de tamaño, emisión de fluorescencia y absorbancia, de los liposomas liofilizados con y sin lioprotector. El tamaño medio de los liposomas de ZnPc (A y B) fue ~600 nm y ~290 nm para liposomas liofilizados, sin y con dextrosa, respectivamente. El tamaño promedio de TAZnPc<sub>A</sub> liofilizado fue de 958 nm y 354 nm sin y con dextrosa, respectivamente; mientras que TAZnPc<sub>B</sub> fue de 789 nm y 263 nm (sin y con dextrosa, respectivamente). El tamaño de los liposomas aumentó después de la liofilización (Tabla 3) con respecto a los valores iniciales (ver Tabla 2) en liposomas liofilizados con y sin dextrosa. El IP muestra un incremento en todas las formulaciones con y sin lioprotector, lo que indica heterogeneidad en la distribución del tamaño de partícula. El incremento de tamaño de los liposomas con lioprotector fue menor en todas las formulaciones. Se observaron leves cambios en los valores de absorbancia y emisión en liposomas liofilizados y reconstituidos (con y sin dextrosa) con respecto a las mediciones iniciales después de la preparación.

Tabla 3. Estabilidad de liposomas a largo plazo, después de 9 meses de almacenamiento a 25°C en oscuridad. Sin y con dextrosa como lioprotector.

Liposoma	Liofilizado, 9 meses de almacenamiento				Liofilizado con dextrosa (lioprotector), 9 meses de almacenamiento			
	Tamaño promedio (nm) ± SD	IP	Emisión (u.a)	Absorbancia (u.a)	Tamaño promedio (nm) ± SD	IP	Emisión (u.a)	Absorbancia (u.a)
ZnPc <sub>A</sub>	623 ± 103	1,53±0,13	385	1,01	296 ± 45	1,51±0,10	347	1,00
ZnPc <sub>B</sub>	625 ± 98	1,60±0,18	415	0,34	287 ± 52	1,25±0,15	405	0,32
TAZnPc <sub>A</sub>	958± 130	1,62±0,20	110	0,11	354 ± 68	1,79±0,19	95	0,11
TAZnPc <sub>B</sub>	789 ± 114	1,57±0,15	272	0,13	263 ± 56	0,82±0,12	258	0,09

IP: Índice de Polidispersidad

Los resultados se presentan como la media ±SD de tres experimentos independientes

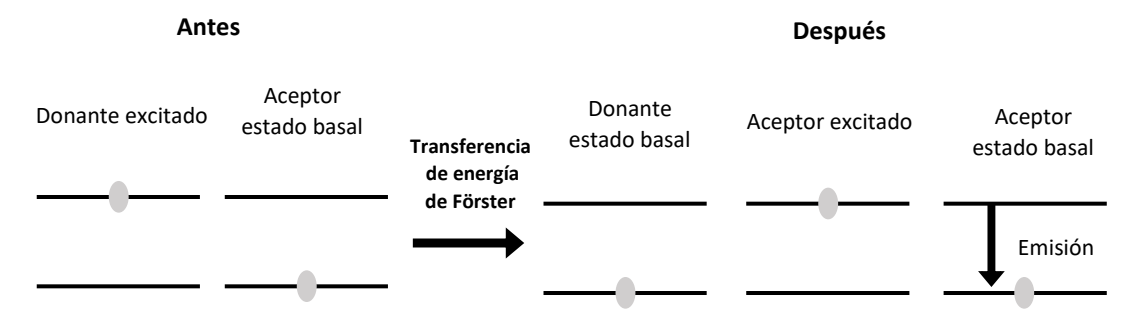
### 6.3.6 Localización de las Pcs en el liposoma

La localización de las Pcs en los liposomas y la interacción con la bicapa lipídica es un parámetro importante a determinar en la caracterización de formulaciones.

La transferencia de energía de Förster (o fluorescence resonance energy transfer, por sus siglas en inglés, FRET) es un proceso fotofísico que implica la transferencia de energía no radiativa desde el estado excitado de una molécula "donante" (D) a una molécula "aceptora" (A). Para que este proceso ocurra, la molécula donante y aceptora tienen que estar a una distancia no mayor a 10nm y depende de la superposición espectral del espectro de emisión del donante con el espectro de absorción del aceptor y del rendimiento cuántico

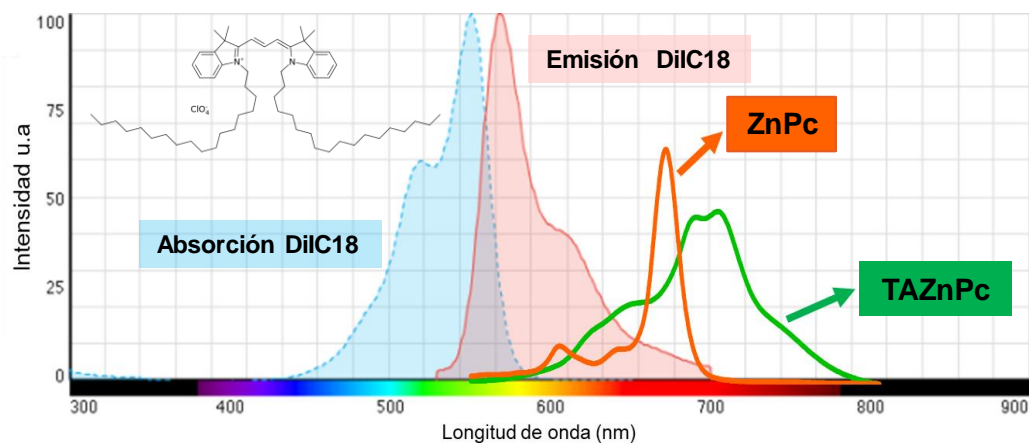
del donante.<sup>46,47</sup> Se aplica ampliamente como una herramienta espectroscópica para detectar la proximidad entre dos moléculas. Como resultado de la transferencia de energía se observa una disminución en la intensidad de fluorescencia emitida por el donante y, si el aceptor es fluorescente, la aparición de una nueva señal fluorescente. Se puede observar la disminución de la fluorescencia de D o el aumento de la emisión de A, ver Esquema 2.

Esquema 2



Considerando que las dos Pcs incorporadas en liposomas son lipofílicas, es de esperar que se intercalen en la bicapa lipídica, entre las cadenas hidrofóbicas de los fosfolípidos. Para evaluar esto, se sintetizaron liposomas con un marcador fluorescente que se intercala en las cadenas hidrofóbicas de los fosfolípidos, el 1,1'-Dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato (DiI C18) a fin de evaluar la posibilidad de que ocurra un proceso de FRET entre este y las Pcs utilizadas. Las Pcs se agregaron en el momento de realizar el experimento. En el Esquema 3 se muestra la estructura molecular y el espectro de absorción y emisión del fluoróforo (DiI C18) y la banda Q de los espectros de absorción de las Pcs. La longitud de onda de excitación utilizada en los experimentos de FRET fue  $\lambda_{exc}$  DiI C18: 520nm.

Esquema 3. Espectros de absorción y emisión del DiI C18 y de Pcs



Los liposomas control (con DiI C18 y sin Pcs) con el agregado de solvente (DMSO) no registraron FRET. A fin de detectar mejor la interacción entre el fluoróforo y las Pc se registraron espectros cada 5 min por un tiempo total de 80 min, ya que las Pcs se añaden a la solución de PBS con liposomas y tienen que difundir hacia la bicapa.

En la Figura 7 se muestran los espectros de emisión de los liposomas de DPPC-col con el fluoróforo en la bicapa a los que se le añadieron ZnPc y TAZnPc (Figura 7 a y b, respectivamente). En la Figura 7a, se graficó la emisión del fluoróforo (donante) en liposomas (T0, banda amarilla a 570nm), las bandas por debajo son las que resultan del agregado de ZnPc (aceptor) y mediciones en el tiempo. Se observa una disminución en la intensidad de las bandas del donante a 570nm a medida que transcurre el tiempo T1 (bordó) a T80 min (azul). A su vez, hay un incremento en la señal de emisión del aceptor (ZnPc) a 675nm, como puede observarse en la ampliación de la imagen 7a. Estos resultados sugieren una proximidad de las moléculas, fluoróforo y ZnPc, en las cadenas hidrofóbicas de los fosfolípidos; ya que se observa transferencia de energía, al excitar el fluoróforo. En la Figura 7b, se graficó la emisión del fluoróforo en liposomas (T0, banda amarilla a 570nm), al igual que ZnPc, las bandas por debajo son las que resultan del agregado de TAZnPc y mediciones en el tiempo. Se observa una disminución en la señal del donante a medida que transcurre el tiempo lo que sugiere transferencia de energía a un aceptor a una distancia menor a 10nm; esta disminución en la señal es menor que ZnPc, y puede deberse a que necesita mayor tiempo para difundir hacia el interior de la bicapa. No se observa señal en la emisión de la Pc (710nm). Esto puede deberse a que la intensidad de fluorescencia de TAZnPc es menor que la ZnPc y que, además la  $\lambda_{max}$  de absorción de TAZnPc está más desplazada hacia el rojo por lo que la transferencia de energía ocurre, pero la emisión no llega a detectarse, porque se está excitando en una zona de baja absorción (ver esquema 3).

La disminución en la emisión de la banda amarilla (T0) a la T1 en ambos espectros se debe a la dilución que produce el agregado de la Pc al sistema liposomal.

El objetivo de este experimento es evaluar la localización de las Pcs dentro del liposoma, para ellos, se ensayó FRET en liposomas compuestos por otro fosfolípido, dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) sin el agregado de colesterol. Esta bicapa es mucho más permeable que la de DPPC-col por lo que podría observarse mejor la transferencia de energía ya que la difusión de las Pcs podría ser más rápida hacia el interior de la bicapa. Esto permitiría reforzar la idea de que las Pcs se alojan en las cadenas hidrofóbicas de los fosfolípidos. La metodología de trabajo fue la descripta anteriormente.

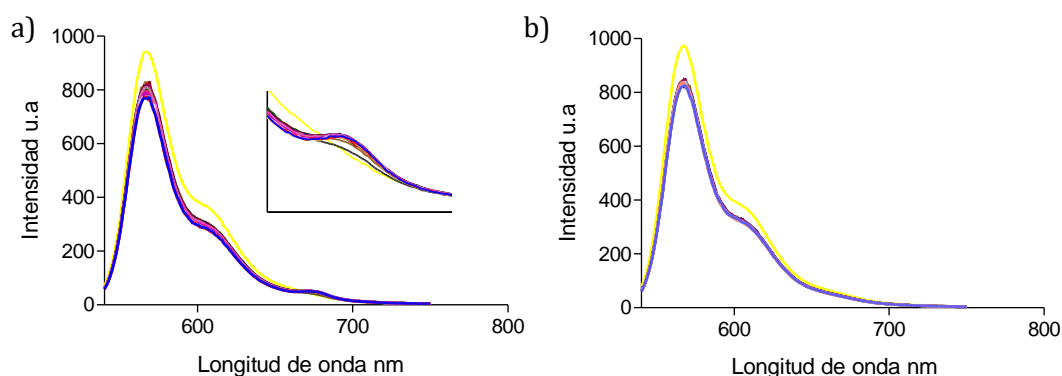


Figura 7. Espectro de emisión del fluoróforo (DiI C18) en liposomas de DPPC-col con el agregado de a)ZnPc y b)TAZnPc.  $\lambda_{exc}$  DiI C18: 520nm

En la Figura 8 se muestran los espectros de emisión de los liposomas de DMPC con el fluoróforo en la bicapa, a los que se añadieron ZnPc y TAZnPC (Figura 8 a y b, respectivamente). Ambas Pcs presentaron una disminución más marcada de la banda a 570 nm del fluoróforo y la emisión de ZnPc (aceptor) a 675nm mostró mayor intensidad (ver ampliación de Figura 8a) a medida que aumentaba el tiempo de contacto respecto a la emisión de los liposomas de DPPC-col. Estos resultados reafirman los obtenidos con los liposomas de DPPC-col, ya que se observa una transferencia de energía por parte del fluoróforo (donante) que muestra un decaimiento, hacia las Pcs (aceptor).

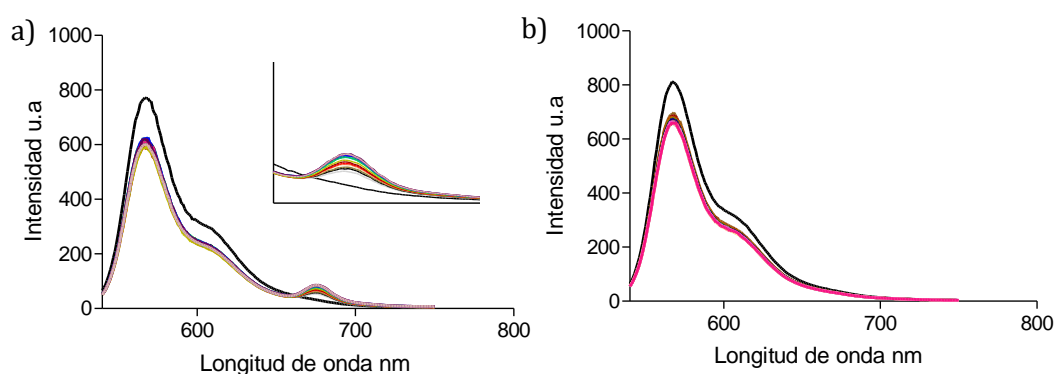


Figura 8. Espectro de emisión del fluoróforo (DiI C18) en liposomas de DMPC con el agregado de a)ZnPc y b)TAZnPc.  $\lambda_{exc}$  DiI C18: 520nm

### 6.3.7 Propiedades fotofísicas en medio de cultivo

Las propiedades fotofísicas de las Pcs como absorbancia y emisión, se modifican dependiendo el medio en el que se evalúen.<sup>48</sup> En los experimentos de TFD, los ensayos *in vitro* se realizan en medio de cultivo, cuya composición contiene una base acuosa. Se

realizaron ensayos para determinar cómo impacta la vehiculización de las Pcs las propiedades fotofísicas en medio de cultivo.

Para ello se determinaron los espectros de absorción y emisión de ZnPc y TAZnPc incorporadas en una concentración de 0,5  $\mu$ M al medio de cultivo DMEM, con suero fetal bovino (SFB). Se compararon los resultados obtenidos al utilizar las formulaciones Pc-liposoma vs la solución de Pc en DMF. En la Figura 9, se muestran en gráficos de barra cómo se modifican las intensidades de absorción y emisión, de ambas Pcs en las diferentes condiciones ensayadas.

En la Figura 9a se muestran las intensidades de absorción (ZnPc  $\lambda_{\max}$ :670 nm, TAZnPc  $\lambda_{\max}$ :702nm). Las barras con y sin líneas horizontales, corresponden a ZnPc y TAZnPc respectivamente. Como puede observarse, a una misma concentración (0,5 $\mu$ M) en DMEM y SFB, hay una mayor absorción en ambas Pcs incorporadas en liposomas respecto a las que están en solución de DMF. A su vez, si se comparan las dos formulaciones liposomales A y B, para ambas Pcs, la formulación B es la que posee mayor intensidad de absorción. Esto concuerda con los resultados presentados en la sección 6.3.3.3 en donde se observa un efecto de agregación en las bandas atribuido a la relación entre la cantidad de lípidos y Pcs en cada liposoma. La formulación B, posee menor cantidad de ftalocianina, lo que disminuye la agregación y este efecto se observa también cuando se diluyen en medio de cultivo.

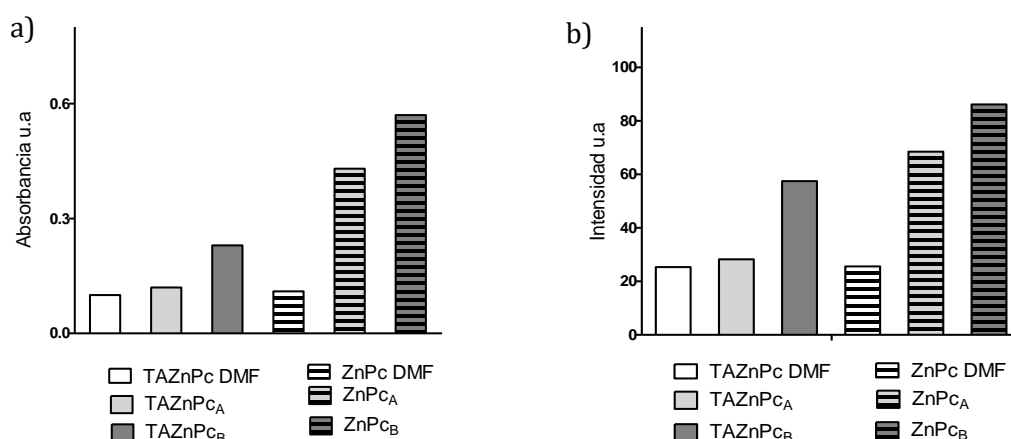


Figura 9. Intensidades a) absorción, b) Emisión de las Pcs 0,5 $\mu$ M incorporadas en DMEM-SFB desde formulación Pc-liposoma y solución de DMF.

La Figura 9b muestra las intensidades de emisión (ZnPc  $\lambda_{\max}$ : 675 nm, TAZnPc  $\lambda_{\max}$ :712 nm). Las barras, con y sin líneas horizontales, corresponden a ZnPc y TAZnPc respectivamente. El efecto en las intensidades de emisión de fluorescencia de las Pcs a

0,5 $\mu$ M en DMEM y SFB muestran un comportamiento similar al de absorción. En donde la mayor emisión corresponde a la formulación B, y la menor emisión a las Pcs en DMF. La formulación con menor carga de Pcs aumenta aún más la emisión y la absorción.

Estos resultados indican que las propiedades fotofísicas de ambas Pcs, cuando se miden en medio de cultivo, mejoran notablemente si las Pcs están incorporadas en liposomas.

## 6.4 Conclusiones

Se sintetizaron liposomas por el método de inyección con un solvente de menor toxicidad respecto al reportado en bibliografía y con una eficiencia de encapsulación mayor al 70%. El tamaño de los liposomas de ZnPc no varió con la carga de Pcs, sin embargo, los de TAZnPc con mayor relación Pc/lípidos (TAZnPc<sub>A</sub>), tuvieron un tamaño mayor que los de menor relación (TAZnPc<sub>B</sub>). Los índices de polidispersidad fueron menores a 0,3 en todos los casos, lo que indica uniformidad en el tamaño.

Los espectros de absorción y emisión de las formulaciones Pc-liposomas en PBS, no presentaron cambios con relación a los obtenidos en solvente (DMF), tanto en el perfil como en el valor de  $\lambda_{max}$ , pero se observó una disminución de la intensidad debido a la opacidad de la formulación liposomal. Las formulaciones liposomales con mayor relación Pc/lípidos (A) presentaron agregación en los espectros. Los liposomas permanecieron estables durante 15 días. Cuando se ensayó la estabilidad a largo plazo, liposomas liofilizados con posterior reconstitución, el incremento de tamaño de los liposomas con lioprotector fue menor en todas las formulaciones. Los valores de absorbancia y emisión en los liposomas reconstituídos (con y sin dextrosa) no presentaron grandes cambios respecto a los iniciales.

La localización de las Pcs en los liposomas analizada por FRET mostró una proximidad entre el fluoróforo intercalado en la membrana y las Pcs, lo que sugiere la localización de las Pcs entre las cadenas hidrofóbicas. Los liposomas de DMPC mostraron un efecto FRET más intenso debido a que la bicapa es más permeable que las de DPPC y colesterol.

Los estudios fotofísicos en medio de cultivo, mostraron una considerable mejora cuando las Pcs se incorporan al medio desde sus formulaciones Pc-liposoma respecto de aquellas que se agregan al medio desde soluciones en DMF. Estos resultados muestran que el uso de las Pc-liposomas podrían mejorar los resultados en terapia fotodinámica.



## 6.5 Sección experimental

### 6.5.1 Equipamiento para espectroscopía

Los espectros de absorción se midieron en espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. Los espectros de emisión se registraron en el espectrofotómetro de fluorescencia Eclipse Cary de Agilent. Ambos espectrofotómetros están equipados con sistema termostatzado.

### 6.5.2 Fotosensibilizadores

Las ftalocianinas utilizadas para realizar las Pcs de tercera generación, se sintetizaron y purificaron como se describe en el Capítulo 2 “Síntesis de Ftalonitrilos y Ftalocianinas”.

### 6.5.3 Síntesis de liposomas

Los fosfolípidos y colesterol fueron suministrados por Avanti Lipids.

Los liposomas se prepararon de acuerdo con un protocolo modificado del procedimiento de inyección de etanol desarrollado por Kremer *et al.*<sup>49</sup> Las soluciones madre de Pcs se prepararon en DMSO. Las soluciones de Pcs ~ 1 y 0,2 mM, se utilizaron en las formulaciones “A” y “B”, respectivamente, y se almacenaron a 4°C. La solución lipídica se preparó a una concentración de 7,68 mM de DPPC y 1,19 mM de colesterol en etanol absoluto.

Para la preparación de liposomas de Pc, se añadieron 0,265 ml de cada solución de Pc a 0,735 ml de la solución de fosfolípido y colesterol. Se inyectaron 0,375 ml de esta mezcla en 5 ml de una solución acuosa tamponada con fosfato de pH 7,4. La inyección se realizó a una velocidad de 1  $\mu$ l/s con agitación magnética a 55°C,<sup>34</sup> temperatura por encima de la temperatura de transición principal de DPPC (41°C).<sup>50</sup> Se prepararon liposomas de control utilizando el mismo protocolo pero sin Pc (solo DMSO).

### 6.5.4 Caracterización de liposomas

Para la caracterización de liposomas, se midieron diversos parámetros. Los métodos incluyeron el tamaño promedio y el análisis de índice de polidispersidad, la eficiencia de encapsulación y el estudio de estabilidad.

#### 6.5.4.1 *Mediciones de tamaño de liposomas.*

El tamaño y el índice de polidispersidad de los liposomas se determinaron mediante dispersión dinámica de la luz (DLS), en un instrumento Delsa Nano C (Beckman Coulter) equipado con un diodo láser de 658 nm, con un ángulo de dispersión de 165 °.

#### 6.5.4.2 *Espectroscopía.*

Los espectros de absorción y fluorescencia se registraron a  $25,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de longitud. Las  $\lambda$  de excitación fueron para ZnPc 645nm y para TAZnPc 685nm.

#### 6.5.4.3 *Eficiencia de la encapsulación*

El porcentaje de eficiencia de encapsulación (% EE) de Pcs se determinó mediante la técnica de ultracentrifugación.<sup>13</sup> Los liposomas se centrifugaron (Beckman Coulter Optimal LE-80K Ultracentrifuge) a 45000 RPM durante 2 horas a 4°C. Los sedimentos de liposomas se resuspendieron con PBS pH 7,4 y se añadió DMF para producir la disrupción de la membrana liposomal. Se realizaron soluciones testigo con la carga inicial de Pc, lípidos y DMF en la misma proporción que los liposomas ultracentrifugados, con el fin de comparar las absorbancias del pellet con las soluciones testigo. Las mediciones en espectrofotometría UV-vis se realizaron para la cuantificación de Pcs. La eficiencia de encapsulación se determinó por triplicado.

El % E.E. de las Pcs se calculó de la siguiente manera:

$$\%EE = \left[ \frac{Pc\text{ incorporada}}{Carga\text{ inicial de Pc}} \right] \times 100$$

Pc incorporada = absorbancia del sedimento

Carga inicial de Pc = absorbancia del testigo de la carga inicial

ZnPc  $\lambda_{\text{abs}}$ : 670 nm, TAZnPc  $\lambda_{\text{abs}}$ : 702 nm.

#### 6.5.5 Estabilidad a corto plazo

Como parámetros de estabilidad de los liposomas se midieron fluorescencia, absorbancia, tamaño y el índice de polidispersidad, inmediatamente a partir de la preparación y con posterioridad, a los siete y quince días de almacenamiento en la oscuridad a 25°C.

### 6.5.6 Estabilidad a largo plazo

Los liposomas recién preparados se liofilizaron. Se utilizó solución de Dextrosa al 10% como lioprotector.<sup>45</sup> Los liposomas, con o sin dextrosa, se congelaron con nitrógeno líquido. Las muestras congeladas se colocaron en la cámara de secado, liofilizador Freezone-6, Labconco. La liofilización se realizó a una presión de 12 Pa durante 12 h. Los liposomas liofilizados se almacenaron a  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$  durante nueve meses en la oscuridad hasta tratamientos adicionales. Los liposomas liofilizados (polvo) se rehidrataron con agua ultrapura hasta su volumen original.

### 6.5.7 Localización de las Pcs en los liposomas

Se realizaron liposomas de DPPC-col y de DMPC, para ello se prepararon soluciones de lípidos en etanol de 7,68mM de DPPC y 1,19 col, y de 7,68mM de DMPC, respectivamente. La síntesis se realizó al igual que en la sección 6.5.2 por el método de inyección, en donde se colocaron 0,195mL de solución lípido con 0,018mL de DiL C18 en cloroformo (0,09nmol/mL) y se inyectaron en 2,8 mL de buffer fosfato (PBS) a  $55 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . De esta manera se obtuvieron dos liposomas, DPPC-col y DMPC. La adición de Pcs se realizó posteriormente cuando se llevó a cabo el experimento de FRET.

Los experimentos de FRET, se realizaron con celdas de cuarzo termostalizadas a  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . En primer lugar, se midieron los blancos, es decir, la emisión de los liposomas sintetizados sin ningún agregado y con agregado de solvente (DMSO). Posteriormente se realizaron los agregados de ZnPc y TAZnPc en DMSO midiendo los espectros de emisión en diferentes tiempos, T0 hasta T80 min cada 5 min. La  $\lambda_{\text{exc}}$  fue 520nm y los espectros se registraron en el rango de 530-750nm.

### 6.5.8 Propiedades fotofísicas en medio de cultivo

Las propiedades fotofísicas de las Pcs en DMF e incorporadas en liposomas se midieron en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SFB. Para ello se preparó una dilución de  $0,5\mu\text{M}$  de Pc y de Pc-liposomas en el medio de cultivo para que sean comaprables entre sí, y se determinaron los espectros de absorción y de emisión a  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$  usando una celda de cuarzo con un paso óptico de 1 cm. Las longitudes de onda de excitación, para los espectros de emisión de ZnPc y TAZnPc, fueron 645nm y 685nm respectivamente.

## 6.6 Bibliografía

1. Allison, R. R.; Downie, G. H.; Cuenca, R.; Hu, X.-H.; Childs, C. J. H.; Sibata, C. H., Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **2004**, *1* (1), 27-42.
2. Senge, M. O., mTHPC – A drug on its way from second to third generation photosensitizer? *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **2012**, *9* (2), 170-179.
3. Nyman, E. S.; Hynninen, P. H., Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2004**, *73* (1), 1-28.
4. Lim, C. K.; Heo, J.; Shin, S.; Jeong, K.; Seo, Y. H.; Jang, W. D.; Park, C. R.; Park, S. Y.; Kim, S.; Kwon, I. C., Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of Cancer. *Cancer letters* **2013**, *334* (2), 176-187.
5. de Freitas, L. F.; Hamblin, M. R., Chapter 1 - Antimicrobial photoinactivation with functionalized fullerenes. In *Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy*, Grumezescu, A. M., Ed. William Andrew Publishing: 2016; pp 1-27.
6. Li, X.; Zheng, B.-D.; Peng, X.-H.; Li, S.-Z.; Ying, J.-W.; Zhao, Y.; Huang, J.-D.; Yoon, J., Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: Developments in the last five years. *Coordination Chemistry Reviews* **2019**, *379*, 147-160.
7. Leznoff, C. C.; McKeown, N. B., Preparation of substituted tetrabenzotriazaporphyrins and a tetranaphthotriazaporphyrin: a route to mono-meso-substituted phthalocyanine analogs. *The Journal of organic chemistry* **1990**, *55* (7), 2186-2190.
8. Josefsen, L. B.; Boyle, R. W., Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer? *British journal of pharmacology* **2008**, *154* (1), 1-3.
9. van Leengoed, H.; Cuomo, V.; Versteeg, A. A. C.; van der Veen, N.; Jori, G.; Star, W. M., In vivo fluorescence and photodynamic activity of zinc phthalocyanine administered in liposomes. *British Journal of Cancer* **1994**, *69* (5), 840-845.
10. Calixto, G. M.; Bernegossi, J.; de Freitas, L. M.; Fontana, C. R.; Chorilli, M., Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. *Molecules* **2016**, *21* (3), 342.
11. Yin, R.; Agrawal, T.; Khan, U.; Gupta, G. K.; Rai, V.; Huang, Y. Y.; Hamblin, M. R., Antimicrobial photodynamic inactivation in nanomedicine: small light strides against bad bugs. *Nanomedicine (London, England)* **2015**, *10* (15), 2379-2404.
12. Torchilin, V. P., Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature reviews. Drug discovery* **2005**, *4* (2), 145-160.
13. Laouini, A.; Jaafar-Maalej, C.; Sfar, S.; Charcosset, C.; Fessi, H., Liposome preparation using a hollow fiber membrane contactor--application to spironolactone encapsulation. *International journal of pharmaceutics* **2011**, *415* (1-2), 53-61.
14. García, A. M.; de Alwis Weerasekera, H.; Pitre, S. P.; McNeill, B.; Lissi, E.; Edwards, A. M.; Alarcon, E. I., Photodynamic performance of zinc phthalocyanine in HeLa cells: A comparison between DPCC liposomes and BSA as delivery systems. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **2016**, *163*, 385-390.
15. García, A. M.; Alarcon, E.; Munoz, M.; Scaiano, J. C.; Edwards, A. M.; Lissi, E., Photophysical behaviour and photodynamic activity of zinc phthalocyanines associated to liposomes. *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **2011**, *10* (4), 507-514.

16. Huang, L.; Wei, G.; Sun, X.; Jiang, Y.; Huang, Z.; Huang, Y.; Shen, Y.; Xu, X.; Liao, Y.; Zhao, C., A tumor-targeted Ganetespib-zinc phthalocyanine conjugate for synergistic chemo-photodynamic therapy. *European journal of medicinal chemistry* **2018**, *151*, 294-303.
17. Weijer, R.; Broekgaarden, M.; Kos, M.; van Vught, R.; Rauws, E. A. J.; Breukink, E.; van Gulik, T. M.; Storm, G.; Heger, M., Enhancing photodynamic therapy of refractory solid cancers: Combining second-generation photosensitizers with multi-targeted liposomal delivery. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2015**, *23*, 103-131.
18. Bangham, A. D., A Correlation between Surface Charge and Coagulant Action of Phospholipids. *Nature* **1961**, *192* (4808), 1197-1198.
19. 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* (2), 147-168.
20. Bulbake, U.; Doppalapudi, S.; Kommineni, N.; Khan, W., Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics* **2017**, *9* (2).
21. Gregoriadis, G., Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends in biotechnology* **1995**, *13* (12), 527-537.
22. Gregoriadis, G., *Liposome technology*. CRC press: 1992; Vol. 3.
23. Chapman, D.; Jones, M. N.; Jones, M., *Micelles, monolayers, and biomembranes*. Wiley-Liss: 1995.
24. Jesorka, A.; Orwar, O., Liposomes: Technologies and Analytical Applications. *Annual review of analytical chemistry* **2008**, *1* (1), 801-832.
25. Samad, A.; Sultana, Y.; Aqil, M., Liposomal drug delivery systems: an update review. *Current drug delivery* **2007**, *4* (4), 297-305.
26. Mouritsen, O. G.; Bagatolli, L. A., *Life-as a matter of fat: lipids in a membrane biophysics perspective*. Springer: 2015.
27. Marsh, D., Analysis of the bilayer phase transition temperatures of phosphatidylcholines with mixed chains. *Biophys J* **1992**, *61* (4), 1036-1040.
28. Ait-Oudhia, S.; Mager, D. E.; Straubinger, R. M., Application of pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis to the development of liposomal formulations for oncology. *Pharmaceutics* **2014**, *6* (1), 137-174.
29. Nagayasu, A.; Uchiyama, K.; Kiwada, H., The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. *Adv Drug Deliv Rev* **1999**, *40* (1-2), 75-87.
30. Yang, F.; Jin, C.; Jiang, Y.; Li, J.; Di, Y.; Ni, Q.; Fu, D., Liposome based delivery systems in pancreatic cancer treatment: from bench to bedside. *Cancer treatment reviews* **2011**, *37* (8), 633-642.
31. Senior, J.; Gregoriadis, G., Stability of small unilamellar liposomes in serum and clearance from the circulation: the effect of the phospholipid and cholesterol components. *Life sciences* **1982**, *30* (24), 2123-2136.
32. Gabizon, A.; Papahadjopoulos, D., The role of surface charge and hydrophilic groups on liposome clearance in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1992**, *1103* (1), 94-100.
33. Senior, J. H.; Trimble, K. R.; Maskiewicz, R., Interaction of positively-charged liposomes with blood: implications for their application in vivo. *Biochimica et biophysica acta* **1991**, *1070* (1), 173-179.

34. Ginevra, F.; Biffanti, S.; Pagnan, A.; Biolo, R.; Reddi, E.; Jori, G., Delivery of the tumour photosensitizer zinc(II)-phthalocyanine to serum proteins by different liposomes: studies in vitro and in vivo. *Cancer letters* **1990**, *49* (1), 59-65.
35. Willson, J. E.; Brown, D. E.; Timmens, E. K., A toxicologic study of dimethyl sulfoxide. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1965**, *7* (1), 104-112.
36. Leslie, G. B.; Hanahoe, T. H. P.; Ireson, J. D.; Sturman, G., Some pharmacological properties of pyridine. *Pharmacological Research Communications* **1973**, *5* (4), 341-365.
37. Rowe, R. C.; Sheskey, P.; Quinn, M., *Handbook of pharmaceutical excipients*. Libros Digitales-Pharmaceutical Press: 2009.
38. McKim, A.; Strub, R., Dimethyl sulfoxide USP, PhEur in approved pharmaceutical products and medical devices. *Pharmaceutical Technology* **2008**, *32* (5), 74.
39. Strickley, R. G., Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharmaceutical research* **2004**, *21* (2), 201-230.
40. Bellavance, M. A.; Poirier, M. B.; Fortin, D., Uptake and intracellular release kinetics of liposome formulations in glioma cells. *International journal of pharmaceutics* **2010**, *395* (1-2), 251-259.
41. Oliveira, C. A.; Machado, A. E.; Pessine, F. B., Preparation of 100 nm diameter unilamellar vesicles containing zinc phthalocyanine and cholesterol for use in photodynamic therapy. *Chemistry and physics of lipids* **2005**, *133* (1), 69-78.
42. Diz, V. E.; Gauna, G. A.; Strassert, C. A.; Awruch, J.; Dixelio, L. E., Photophysical properties of microencapsulated phthalocyanines. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2010**, *14* (03), 278-283.
43. Isago, H., *Optical spectra of phthalocyanines and related compounds*. Springer: 2015.
44. Li, B.; Li, S.; Tan, Y.; Stolz, D. B.; Watkins, S. C.; Block, L. H.; Huang, L., Lyophilization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes. *Journal of pharmaceutical sciences* **2000**, *89* (3), 355-364.
45. Glavas-Dodov, M.; Fredro-Kumbaradzi, E.; Goracinova, K.; Simonoska, M.; Calis, S.; Trajkovic-Jolevska, S.; Hincal, A. A., The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU. *International journal of pharmaceutics* **2005**, *291* (1-2), 79-86.
46. 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.
47. Krishnaveni, R.; Ramamurthy, P., Förster resonance energy transfer between acridinediones and selected fluorophores—Medium dependence. *Journal of Luminescence* **2013**, *138*, 242-250.
48. Ogunsipe, A.; Maree, D.; Nyokong, T., Solvent effects on the photochemical and fluorescence properties of zinc phthalocyanine derivatives. *Journal of Molecular Structure* **2003**, *650* (1-3), 131-140.
49. Kremer, J. M. H.; Van der Esker, M. W.; Pathmamanoharan, C.; Wiersema, P. H., Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. *Biochemistry* **1977**, *16* (17), 3932-3935.
50. Mabrey, S.; Sturtevant, J. M., Investigation of phase transitions of lipids and lipid mixtures by sensitivity differential scanning calorimetry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1976**, *73* (11), 3862-3866.

---

## Capítulo 7

---

### Aplicaciones de fotosensibilizadores de 3<sup>o</sup> generación. Ensayos *in vitro* en terapia fotodinámica y terapia fotodinámica antimicrobiana

7.1	Introducción.....	155
7.2	Objetivos.....	157
7.3	Resultados y discusión.....	158
7.3.1	Pruebas <i>in vitro</i> en Células de glioblastoma.....	158
7.3.2	Pruebas <i>in vitro</i> en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	162
7.4	Conclusiones.....	168
7.5	Materiales y Métodos.....	170
7.5.1	Pruebas <i>in vitro</i> en Células de glioblastoma.....	170
7.5.2	Pruebas <i>in vitro</i> en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	171
7.6	Bibliografía.....	174





## 7.1 Introducción

Como se ha mencionado en capítulos anteriores, la TFD constituye una alternativa para el tratamiento de diversas enfermedades.<sup>1,2</sup> Las ftalocianinas (Pcs) tienen potencial fotoquímico significativo para la aplicación en TFD. La mayoría son altamente lipofílicas, esta característica, contribuye a la solubilización del fotosensibilizador (PSs) en la bicapa lipídica de la membrana celular. Sin embargo, la naturaleza hidrofóbica y la falta de solubilidad en medios acuosos dificultan el desarrollo de formulaciones farmacéuticas, siendo la agregación, lo que afecta negativamente al rendimiento cuántico de oxígeno singlete.<sup>3</sup> Actualmente, los liposomas juegan un papel importante en la TFD. Numerosos PSs se han encapsulado con éxito en diferentes formulaciones liposomales, dando origen a los fotosensibilizadores de tercera generación. La variedad de fosfolípidos disponibles para la preparación de liposomas, podría influir en la fluidez de la membrana y la liberación de los PSs.<sup>4</sup>

En el capítulo 5, se presentó a la TFD como una alternativa para tratar tumores cerebrales en etapas tempranas y avanzadas ya que ha proporcionado resultados prometedores en estudios *in vitro* e *in vivo* (animales).<sup>5,6</sup> Los glioblastomas son tumores cerebrales extremadamente agresivos que son resistentes a las terapias convencionales utilizadas para tratar otros tipos de tumores.<sup>7</sup> Diferentes estudios han sugerido que las Pcs administradas en liposomas pueden mejorar la eficacia de la TFD.<sup>8,9,10,11</sup> Además, los liposomas podrían ser una promesa para la administración de fármacos en TFD de glioblastoma ya que su uso clínico ha sido aprobado en diferentes aplicaciones y se encuentran entre las nanotecnologías más utilizadas para la administración en cerebro.<sup>6,12</sup>

La terapia fotodinámica antimicrobiana (TFDA) ha resurgido en la última década como un método alternativo contra algunas bacterias patógenas resistentes.<sup>13,14</sup> TFDA presenta varias ventajas sobre los antibióticos; por ejemplo, ausencia de toxicidad sistémica fuera del área irradiada y no se desarrolla resistencia contra los fotosensibilizadores (PSs).<sup>15</sup> Debido a sus características, TFDA ha sido ampliamente estudiada en los últimos años, y se han explorado varias clases de fotosensibilizadores.

La tuberculosis (TB) es una de las 10 principales causas de muerte en el mundo y la principal generada por un solo agente infeccioso (por encima del VIH / SIDA).<sup>16</sup> La enfermedad de TB es causada por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), una bacteria patógena que se transmite exclusivamente por vía aérea.<sup>17</sup> La envoltura celular micobacteriana comprende capas internas de membrana y peptidoglicano que son similares

a las de los organismos Gram-negativos y Gram-positivos comunes, pero que divergen considerablemente en la composición molecular de sus capas externas. Los más prominentes son los ácidos micólicos que están anclados covalentemente a las cadenas de arabinogalactanos (ver Figura 1).<sup>18</sup>

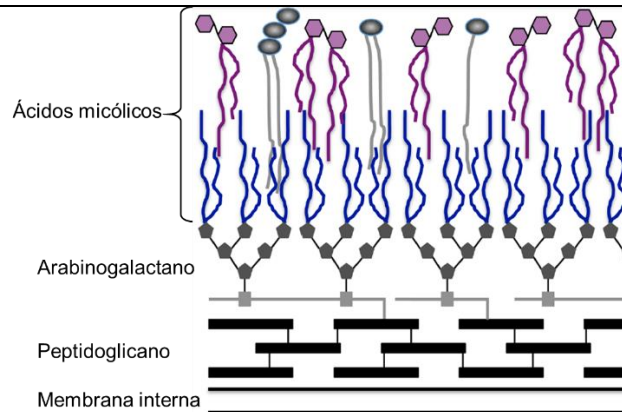


Figura 1. Representación esquemática de la pared celular de micobacterias. Imagen extraída de J. Am. Chem. Soc. 2017, 139, 9, 3488-3495.<sup>18</sup>

En el 85% de los pacientes diagnosticados con TB, el pulmón es el principal órgano objetivo, pero la enfermedad puede extenderse a otras partes del cuerpo (enfermedad extrapulmonar).<sup>19</sup> En 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró que la epidemia de tuberculosis era una emergencia mundial de salud pública,<sup>20</sup> en la actualidad, millones de personas se continúan enfermando cada año.<sup>16</sup> Se estima que alrededor del 23% de la población mundial tiene una infección latente y, por lo tanto, esas personas corren el riesgo de desarrollar la enfermedad activa durante su vida. En 2017, 10 millones de personas desarrollaron TB, entre las cuales 558000 casos fueron TB resistentes a la rifampicina (RR-TB), el fármaco de primera línea más eficaz, y de éstos, el 82% tenían TB resistente a múltiples fármacos (MDR-TB) (resistente a rifampicina e isoniazida).<sup>16</sup> El mismo año, la OMS informó los agentes patógenos prioritarios, causantes de infecciones bacterianas resistentes a los medicamentos, que debían ser objeto de investigación para el desarrollo de nuevos antibióticos. Este documento aborda la MDR-TB por separado, describiendo la situación (la MDR-TB fue declarada crisis mundial en 2014 por la OMS) y la necesidad urgente de nuevos tratamientos.<sup>17</sup> Los pacientes infectados con MDR-*M. tuberculosis* requieren medicamentos de segunda línea y un tratamiento prolongado que es menos efectivo, más costoso y con mayor toxicidad que los aplicados en las cepas susceptibles a los medicamentos. Solo el 54% de los casos de MDR-TB son curables, en comparación con el 83% de los casos susceptibles.<sup>17,21</sup>

Estudios previos de TFDA, informaron la fotoinactivación efectiva de *M. tuberculosis*, aplicando radaclorina como fotosensibilizador, lo que sugiere que la TFDA podría ser una terapia alternativa efectiva para la TB resistente.<sup>22,23</sup> Las Pcs, han surgido como una nueva clase de fotosensibilizadores que muestran un alto efecto antimicrobiano, incluso frente a cepas bacterianas resistentes a los medicamentos, aisladas de hospitales.<sup>24,25</sup> Como se mencionó anteriormente, la eficiencia de las Pcs en medios acuosos disminuye como consecuencia de su naturaleza lipofílica que limita la solubilidad en agua, y conducen a la formación de agregados en solventes polares.<sup>26</sup> La encapsulación en liposomas permite mejorar la solubilidad y reducir la agregación.<sup>27</sup>

Varios PSs se han encapsulado en diferentes formulaciones liposomales con alto impacto en la eficacia de la TFD,<sup>9,10</sup> los estudios de TFDA aplicando PSs en liposomas contra bacterias son aún limitados.<sup>28</sup>

## 7.2 Objetivos

Teniendo presente las posibles aplicaciones de los fotosensibilizadores de tercera generación, se planteó como objetivo general de este capítulo “Evaluar las aplicaciones de ftalocianinas vehiculizadas en liposomas en terapia fotodinámica y en terapia fotodinámica antimicrobiana”.

Para cumplir con el objetivo general, se plantearon como objetivos específicos:

Evaluar la actividad de los fotosensibilizadores de tercera generación en terapia fotodinámica, con ensayos *in vitro* en células de glioblastoma; y comparar dicha actividad con los de segunda generación.

Evaluar la actividad de los fotosensibilizadores de tercera generación en terapia fotodinámica antimicrobiana, con ensayos *in vitro* en *M. tuberculosis*, tanto en una cepa sensible como en una multirresistente.

## 7.3 Resultados y discusión

A modo de aclaración, tener presente que, en todos los casos, los PSs incorporados en liposomas son utilizados en PBS.

### 7.3.1 Pruebas *in vitro* en Células de glioblastoma

El desarrollo de nuevos PSs es de gran importancia para el tratamiento de cáncer en casos donde otras terapias no son efectivas, como en glioblastomas. Con el fin de evaluar la efectividad en TFD en células de glioblastoma T98G, de los fotosensibilizadores de tercera generación sintetizados previamente, se realizaron pruebas *in vitro*, utilizando dos Pcs, vehiculizadas en liposomas. Este estudio se realizó en colaboración con el Dr. Cesar Prucca del grupo de investigación de la Dra. Beatriz Caputto del CIQUIBIC – FCQ, UNC.

#### 7.3.1.1 Fotosensibilizadores utilizados

En términos de la efectividad de la TFD, la profundidad de penetración de la luz es un parámetro a tener en consideración. Cuando la luz penetra en el tejido, puede ser dispersada o absorbida. El grado de ambos procesos depende del tipo de tejido y de la longitud de onda de la luz.<sup>29</sup> Algunos PS que se excitan con longitudes de onda más largas tienen el potencial de aumentar las profundidades de tratamiento en la TFD de los tumores.<sup>30</sup> Las Pcs utilizados en esta sección fueron TAZnPc y ZnPc (Figura 2) en las formulaciones Pc-liposomas caracterizadas en el capítulo 6, todas ellas tienen una  $\lambda_{\text{máx}}$  de absorción superior a 670 nm que coincide con el rango de la ventana terapéutica.<sup>29</sup>

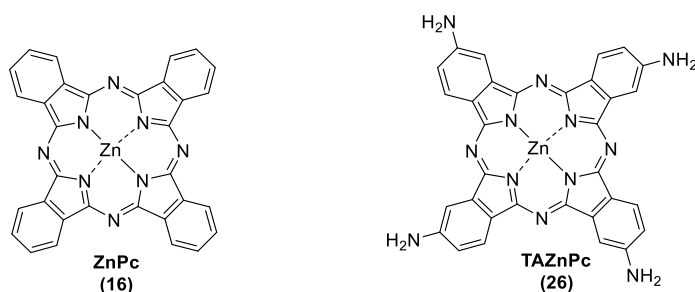


Figura 2. Estructura de las ftalocianinas incorporadas en liposomas utilizadas para los estudios *in vitro* en células de glioblastoma.

### 7.3.1.2 TFD in vitro en células de glioblastoma

Para evaluar la actividad de los PSs de tercera generación, se determinó la fotocitotoxicidad en células de glioblastoma T98G aplicando las formulaciones liposomales de TAZnPc y ZnPc, y se compararon con las observadas para las correspondientes soluciones en *N,N*-dimetilformamida (DMF). Los liposomas utilizados fueron TAZnPc<sub>A</sub>, TAZnPC<sub>B</sub>, ZnPc<sub>A</sub> y ZnPc<sub>B</sub>, en donde las formulaciones “A” son las de mayor relación Pc/lípidos y “B” son las de menores.

Las condiciones de TFD empleadas se corresponden con las determinadas al estudiar TAZnPC y ZnPc en solución de DMF (Capítulo 5). El tiempo de incubación utilizado fue de 18 horas ya que, encontramos en experimentos anteriores (Capítulo 5) que, en ese tiempo, se obtenía la mayor incorporación de las Pcs dentro de las células. Además, ha sido reportado que el tiempo de incubación afecta al mecanismo de muerte celular; tiempos de incubación mayores a dos horas conducen a apoptosis mientras que menores tiempos conducen a necrosis.<sup>8,31,32,33</sup> Se aplicaron dos dosis de luz: 10 y 27 J/cm<sup>2</sup>, que corresponden a 14 y 38 min de irradiación, respectivamente.

Los primeros ensayos se realizaron a fin de evaluar si los fotosensibilizadores presentaban toxicidad en ausencia de irradiación. En la Figura 3 se muestran los resultados de la citotoxicidad en oscuridad. La Figura 3a corresponde a TAZnPc y la 3b a ZnPc. Las barras sin líneas son células tratadas con las soluciones de Pcs en DMF, las barras con líneas verticales y horizontales pertenecen a las células tratadas con la formulación Pc-liposoma A y B respectivamente.

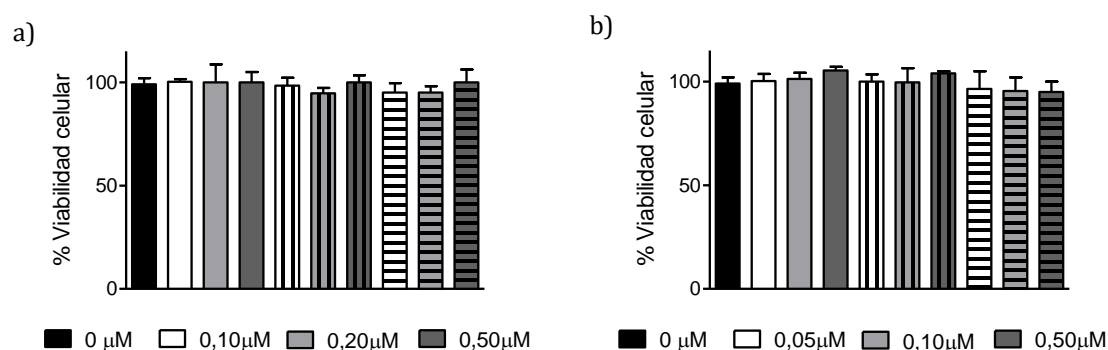


Figura 3. Citotoxicidad en oscuridad en células T98G de a)TAZnPc y b)ZnPc. Barras: sin líneas Pcs en DMF, con líneas Pc-liposomas: verticales formulación “A”, horizontales formulación “B”.

Los ensayos de citotoxicidad en oscuridad mostraron que ambas Pcs en sus distintas formulaciones y en solución, fueron inocuas a diferentes concentraciones, en ausencia de irradiación.

Los ensayos para evaluar los efectos de la TFD con PSs de tercera generación en las células de glioblastoma T98G, se realizaron inicialmente comparando la formulación Pc-liposoma A, con las Pcs en solución de DMF.

En la Figura 4 se muestra el efecto de TAZnPc en solución de DMF (barras sin líneas) o TAZnPc vehiculizada en liposomas (TAZnPc<sub>A</sub> barras con líneas horizontales) en las células T98G. Los ensayos se realizaron a tres concentraciones diferentes 0,1, 0,2 y 0,5  $\mu\text{M}$ . Los resultados muestran citotoxicidad dependiente de la dosis de luz administrada y de la concentración de Pc utilizada. Concentraciones de 0,5  $\mu\text{M}$  combinado con la mayor dosis de luz (27  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) muestran una fuerte reducción de la viabilidad celular  $\sim 85\%$ . La supervivencia de las células T98G después de TFD usando TAZnP<sub>C<sub>A</sub></sub> mostró diferencias en comparación con la solución de DMF a concentraciones más bajas, lo que sugiere que la formulación de liposomas mejora la capacidad fotodinámica de TAZnP<sub>C</sub>.

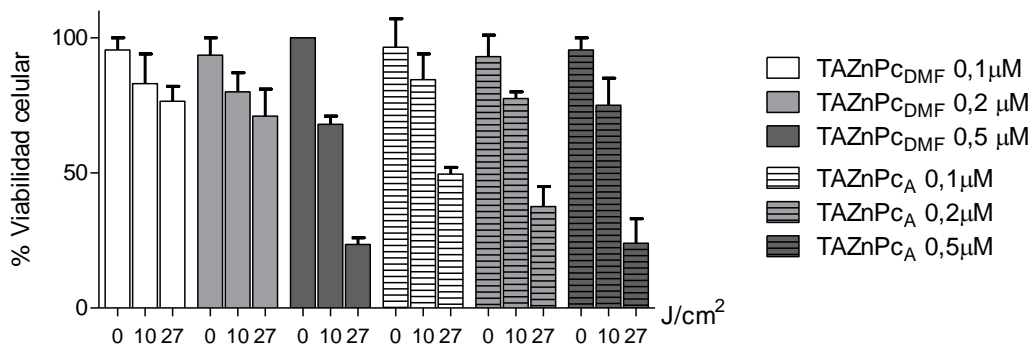


Figura 4. Efectos citotóxicos de TAZnPc en DMF y TAZnP<sub>C<sub>A</sub></sub> en células T98G, a diferentes concentraciones después de irradiar con dos dosis de luz.

En la Figura 5 puede observarse el efecto de la TFD en células T98G, utilizando ZnPc en solución de DMF (barras sin líneas) y ZnPc vehiculizada en liposomas (ZnPc<sub>A</sub> barras con líneas horizontales) a dos concentraciones 0,05 y 0,5  $\mu\text{M}$ . La viabilidad celular después de TFD usando ZnPc en DMF muestra una reducción de  $\sim 90\%$  cuando la concentración de 0,5  $\mu\text{M}$  se combina con cualquiera de las dosis de luz administradas (10 o 27  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). La concentración más baja de ZnPc en DMF (0,05  $\mu\text{M}$ ), muestra un aumento en la supervivencia celular, incrementándose cuando la dosis de luz administrada es menor (10  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). La fotocitotoxicidad de los liposomas de ZnPc<sub>A</sub> (barras con líneas horizontales) muestra una reducción de  $\sim 90\%$  de supervivencia celular de células T98G cuando se utiliza una

concentración final de 0,5 y 0,05  $\mu\text{M}$  combinados con ambas dosis de luz. Estos resultados sugieren que la formulación de  $\text{ZnPc}_A$  es más efectiva en concentraciones más bajas que  $\text{ZnPc}$  en DMF.

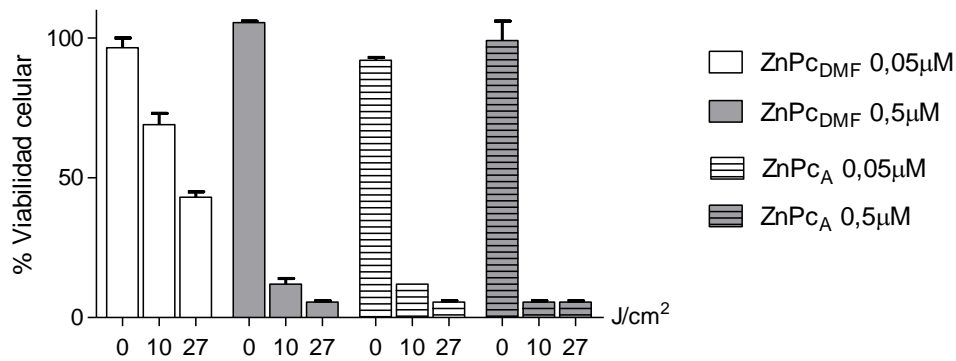


Figura 5. Fotocitotoxicidad de  $\text{ZnPc}$  en DMF y  $\text{ZnPc}_A$  en células T98G a dos concentraciones y dos dosis de luz diferentes 0,05 $\mu\text{M}$  y 0,5  $\mu\text{M}$ .

En el Capítulo 6 se presentó la caracterización de las dos formulaciones de liposomas tanto de  $\text{ZnPc}$  como de  $\text{TAZnPc}$ . Para  $\text{ZnPc}$  no se observaron grandes cambios entre la formulación  $\text{ZnPc}_A$  que contiene mayor relación de Pc/lípidos, respecto de  $\text{ZnPc}_B$ . Sin embargo, para  $\text{TAZnPc}$  el tamaño y la agregación se incrementaron en la formulación con mayor cantidad de Pc ( $\text{TAZnPc}_A$ ). Con el fin de evaluar si la diferencia en la relación Pc/lípidos en el liposoma afecta a la TFD, se realizaron ensayos de muerte celular con ambas formulaciones "A" y "B".

En la Figura 6, se muestra la comparación de la citotoxicidad de  $\text{TAZnPc}_A$  (barras grises) y  $\text{TAZnPc}_B$  (barras negras), utilizando la concentración y dosis de luz más alta (0,5 $\mu\text{M}$  y 27 J/cm², respectivamente) ya que fue la única combinación que alcanzó una reducción de ~85% de viabilidad celular.

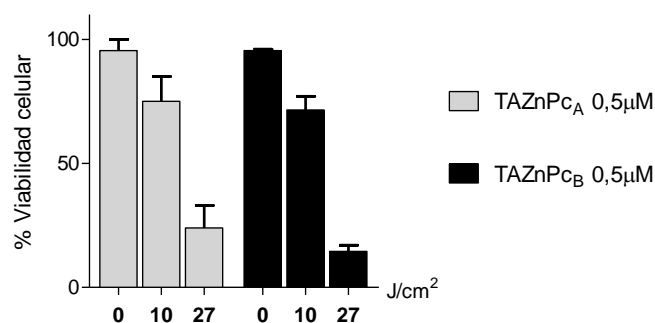


Figura 6. Efecto de las dos formulaciones de  $\text{TAZnPc}$  en células T98G a 0,5 $\mu\text{M}$  y 10 y 27 J/cm².  $\text{TAZnPc}_A$ , líneas horizontales;  $\text{TAZnPc}_B$ , líneas oblicuas.

TAZnPc<sub>A</sub> presenta una leve diferencia en su capacidad de fotoinactivación (~85%) en comparación con la observada para TAZnPc<sub>B</sub> (~90%). Esto podría deberse a la tendencia de agregación que tienen las Pcs con una mayor relación de Pc/lípidos.

En la Figura 7, se muestran los resultados de la fotocitotoxicidad de dos formulaciones de ZnPc, ZnPc<sub>A</sub> (barras con líneas horizontales) y ZnPc<sub>B</sub> (barras con líneas oblicuas). Se ensayaron las concentraciones 0,5 y 0,05 μM, ya que ambas alcanzaron el 90% de muerte celular. Como se puede observar, se logra una reducción de ~ 90% en la supervivencia celular usando ZnPc<sub>A</sub> o ZnPc<sub>B</sub> a 0,5 y 0,05 μM combinado con ambas dosis de luz. La viabilidad de las células de glioblastoma después de la irradiación fue similar con ambas formulaciones de ZnPc, lo que sugiere que una diferencia en la relación lípido/Pc no afecta al comportamiento de ésta Pc en TFD en células de glioblastoma T98G. Tanto ZnPc<sub>A</sub> como ZnPc<sub>B</sub> fueron más efectivos que ZnPc en solución de DMF. La formulación liposomal permite disminuir ~ 10 veces la concentración de ZnPc, de 0,5 μM a 0,05 μM, para obtener la misma reducción de la viabilidad celular que utilizando una solución de DMF.

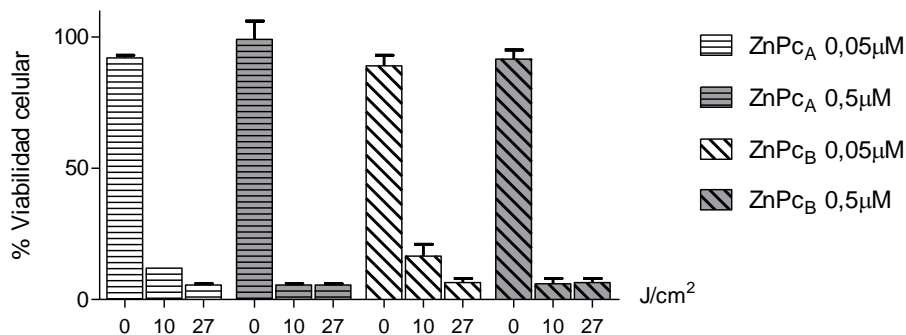


Figura 7. Efecto de las dos formulaciones de liposomas de ZnPc en células T98G a 0,05 μM y 0,5 μM, con ambas dosis de luz 10 y 27 J/cm². ZnPc<sub>A</sub>, líneas horizontales; ZnPc<sub>B</sub>, líneas oblicuas.

### 7.3.2 Pruebas in vitro en *Mycobacterium tuberculosis*

El desarrollo de nuevos medicamentos para el tratamiento de *M. tuberculosis* es un desafío global. Es por ello que en esta sección se evalúa TFD como posible tratamiento de cepas multirresistentes de *M. tuberculosis*, ya que ha sido estudiada en numerosas enfermedades infecciosas. Los experimentos de TFD en *M. tuberculosis*, se realizaron en colaboración con las bioquímicas Leticia Juri y Cristina Cosiansi del Hospital Tránsito Cáceres de Allende.



### 7.3.2.1 Fotosensibilizador utilizado

Para los estudios de TFDA en *M. tuberculosis*, se utilizó ZnPc incorporada en liposomas (PS de tercera generación) y se evaluó su actividad en dos cepas de *M. tuberculosis*, una sensible y otra multirresistente. La formulación utilizada en todos los casos fue ZnPC<sub>A</sub>, ya que no mostró diferencias significativas en la caracterización con ZnPC<sub>B</sub> e incluye menor proporción de lípidos.

### 7.3.2.2 Determinación in vitro de TFDA en células de *Mycobacterium tuberculosis*

Las cepas utilizadas en este estudio fueron *M. tuberculosis* ATCC 27294 (cepa sensible) y una cepa clínica aislada del cultivo de lavados bronquiales de pacientes con tuberculosis (Laboratorio Regional de Tuberculosis, Hospital Tránsito Cáceres de Allende, Córdoba, Argentina). La cepa clínica empleada fue 9037R, MDR-*M. tuberculosis*. La prueba de susceptibilidad en la cepa clínica fue determinada por BACTEC MGIT 960® (Tabla 1), determinando resistencia a la rifampicina (RIF) y la isoniazida (INH). Las mutaciones en el gen rpoB se establecieron mediante secuenciación de Sanger. RpoB con mutaciones L533P (un cambio de L a P en la posición 533) confirmó la resistencia a la RIF.<sup>34</sup> Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (AST) fueron determinadas por el Servicio de Antimicrobianos, Departamento de Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) - ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, Ministerio de Salud y Ambiente, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Tabla 1. Pruebas de susceptibilidad en las dos cepas de *M.tuberculosis*

Cepas de <i>M. tuberculosis</i>	Test de suceptibilidad									Resistencia
	INH	RIF	EM	SM	KM	AM	OX	CM	LV	
ATCC 27294	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Susceptible
9037R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	Multiresistente

INH (isoniazida), RIF (rifampicina), EM (etambutol), SM (estreptomina), KM (kanamicina), AM (amikacina), OX (ofloxacina), CM (capreomicina), LV (levofloxacina), S (susceptible), R (resistente).

En la Figura 8 se muestra un tubo con el cultivo de las colonias de *M.tuberculosis* en medio Lowenstein-Jensen (L-J). Ambas cepas presentan las mismas características de cultivo.



Figura 8. Colonias de *M. tuberculosis* en medio de cultivo LJ.

La eficacia de la fotoinactivación se evaluó en función de la disminución del número de bacterias viables ( $\log_{10}$ ) en las muestras analizadas y de control. Se definió como muerte significativa, una reducción de 3  $\log_{10}$  en UFC/mL.<sup>35</sup> Las unidades formadoras de colonias (UFC) en cada tubo se contaron después de 21, 28 y 40 días de incubación, ya que no se observaron cambios significativos en los resultados, en los gráficos, se muestran los valores del mayor tiempo de incubación, es decir, 40 días después de realizada la TFDA.

En la Figura 9, se muestran los experimentos de control en la oscuridad para descartar que las Pcs sean tóxicas en ausencia de irradiación, se realizaron utilizando 2 y 4 horas de incubación.

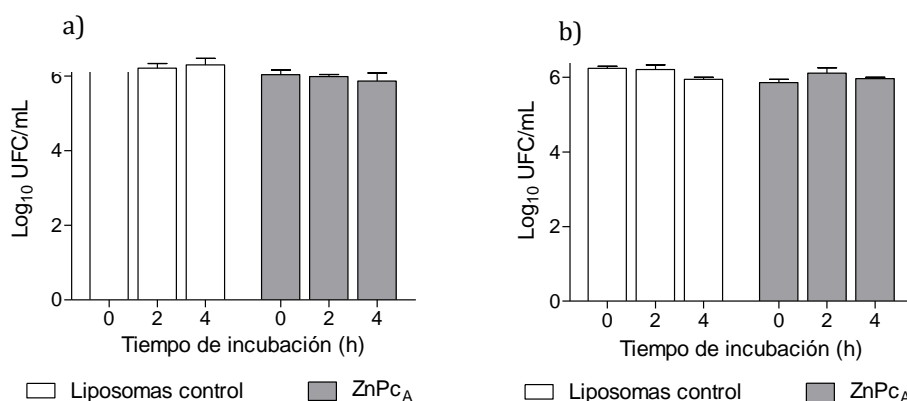


Figura 9. Experimentos control en oscuridad con liposomas control y ZnPc<sub>A</sub> en a) Cepa sensible ATCC 27294 y b) Cepa resistente MDR-*M. tuberculosis*.

El efecto de liposomas control (sin Pc) irradiados, se muestran en los gráficos de actividad fotodinámica para cada bacteria. No se observaron cambios en la viabilidad, después de la TFDA para ambas cepas bacterianas incubadas con liposomas de control e irradiados con diferentes dosis de luz (ver en Figura 10 y 11, “Liposomas control”).

La actividad en TFDA de ZnPc<sub>A</sub> en la cepa *M. tuberculosis* ATCC 27294 susceptible a fármacos se muestra en la Figura 10. Todos los experimentos con la cepa sensible se realizaron usando 2 h de incubación con ZnPc<sub>A</sub>. Los resultados muestran efecto citotóxico de la combinación de ZnPc<sub>A</sub> y luz. La actividad fotodinámica de ZnPc<sub>A</sub> (5,76 µg / mL o 10µM) en *M. tuberculosis* ATCC 27294 produjo una disminución de 2,3 log<sub>10</sub> UFC/mL después de utilizar 30 J/cm<sup>2</sup> como dosis de irradiación. Aunque hubo una disminución, no fue suficiente para generar una reducción de 3 log<sub>10</sub> UFC/mL de inóculo inicial. Un aumento de la dosis de luz a 75 y 150 J/cm<sup>2</sup> genera una reducción de 4,3 log<sub>10</sub> UFC/mL y 5,7 log<sub>10</sub> UFC/mL de supervivencia celular, respectivamente. Estos resultados muestran un claro efecto citotóxico dependiente de la dosis de luz administrada a las bacterias incubadas con liposomas de ZnPc.

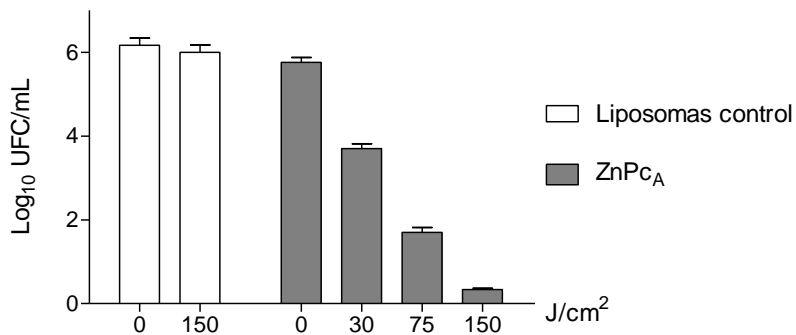


Figura 10. Actividad fotodinámica de liposomas ZnPc<sub>A</sub> comparada con liposomas blanco frente a cepa sensible de *M. tuberculosis* ATCC 27294.

Los efectos de los liposomas de ZnPc<sub>A</sub> en combinación con la luz sobre MDR-*M. tuberculosis* se muestran en la Figura 11. Se observó una reducción de 1,13 log<sub>10</sub> UFC/mL después de 2 h de incubación de MDR-*M. tuberculosis* con ZnPc<sub>A</sub> y 75 J/cm<sup>2</sup> de dosis de luz. Una mayor irradiación (150 J/cm<sup>2</sup>) condujo a una disminución de solo 2 log<sub>10</sub> UFC/mL. El objetivo de 3 log<sub>10</sub> UFC/mL no se alcanzó en las condiciones ensayadas. Con el fin de evaluar si el tiempo de incorporación afecta a la TFDA, se aumentó a 4 h el tiempo de incubación de MDR-*M. tuberculosis* con ZnPc<sub>A</sub>.

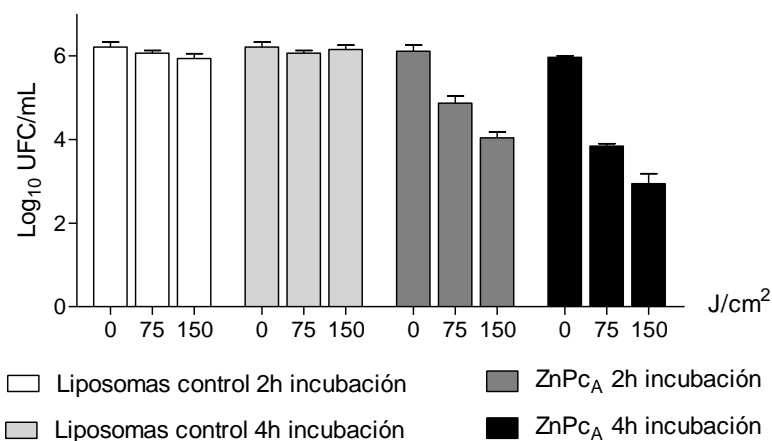


Figura 11. Actividad fotodinámica de liposomas ZnPc<sub>A</sub> comparada con liposomas blanco en cepa resistente MDR-*M. tuberculosis* a dos tiempos de incubación, 2 y 4 horas.

La viabilidad de MDR-*M. tuberculosis* después de 4 h de incubación disminuyó 2,16 log<sub>10</sub> UFC/mL con una dosis de luz de 75 J/cm<sup>2</sup>, comparable al resultado obtenido anteriormente con 2 h de incubación y 150 J/cm<sup>2</sup> de irradiación (2 y 2,1 log<sub>10</sub> UFC/mL, respectivamente). Estos resultados sugieren que la incorporación de ZnPc<sub>A</sub> en MDR-*M. tuberculosis* depende del tiempo de contacto entre la bacteria y el PS. Utilizando la dosis de luz más alta (150 J/cm<sup>2</sup>) y un tiempo de incubación de 4 h, se obtuvo una disminución de 3,06 log<sub>10</sub> UFC/mL.

Los valores de las reducciones de log<sub>10</sub> UFC/mL de ambas bacterias, medidos a los 21, 28 y 40 días pos TFDA, se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Resumen de la disminución de Log<sub>10</sub> UFC/mL de las dos cepas de *M.tuberculosis* a diferentes tiempos de incubación y medidas 21, 28 y 40 días post TFDA.

Días	Dosis de luz J/cm <sup>2</sup>	ATCC 27294 (2h incubación)	MDR- <i>M. tuberculosis</i> (2h incubación)	MDR- <i>M. tuberculosis</i> (4h incubación)
21	30	2,3	-	-
	75	4,3	1	2,67
	150	5,63	2,3	3
28	30	2,3	-	-
	75	4,3	1,3	2,32
	150	5,7	2,1	3,15
40	30	2,3	-	-
	75	4,3	1,13	2,16
	150	5,67	2	3,06

La viabilidad de ambas cepas de *M. tuberculosis* tratadas con ZnPc<sub>A</sub> sin irradiación (0 J/cm<sup>2</sup>), no se vio afectada, lo que indica que la mortalidad celular observada después de la irradiación es causada principalmente por el efecto de fotosensibilización de ZnPc<sub>A</sub> evidenciando una relación directa entre las reducciones log<sub>10</sub> UFC/mL y la dosis de luz administrada.

Estudios previos, sugieren que la baja solubilidad de ZnPc en medios acuosos disminuye la eficiencia de TFDA cuando se aplica en DMF en comparación con los sistemas liposomales.<sup>36</sup> En la Figura 12, se muestra el espectro de absorción de ZnPc en DMF, en liposomas (PBS), y en agua, a concentraciones de 20 μM. Como puede observarse, ZnPc en liposomas y PBS (medio acuoso) mantiene la misma forma espectral que en solución de DMF, con una disminución en la intensidad debido a la opacidad de la formulación. El espectro de ZnPc en agua muestra una baja absorción y un ensanchamiento de banda indicando que está agregada. Ha sido reportado en literatura que los PSs administrados en liposomas<sup>37</sup> pueden mejorar la eficacia de TFD<sup>8,10,11</sup> o TFDA.<sup>38,39</sup>

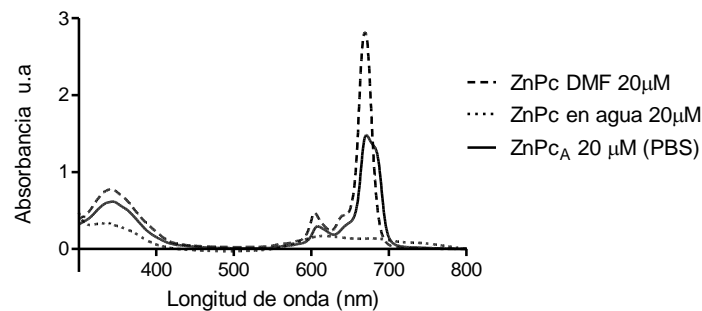


Figura 12. Espectros de absorción de ZnPc en DMF, agua y en PBS incorporada en liposomas

Estos resultados utilizando PSs de tercera generación, ZnPc<sub>A</sub>, en el tratamiento de MDR-*M. tuberculosis*, fueron similares a los observados con otro fotosensibilizador (radaclorina, soluble en agua).<sup>22</sup>

Debido a la fluidez, los liposomas pueden mejorar la interacción entre la pared bacteriana, ya que podrían unirse con las bacterias aumentando la difusión de los PSs en las células.<sup>28</sup> Dua *et al.* informaron que la formulación liposomal podría ser beneficiosa en los tratamientos contra la tuberculosis.<sup>40</sup> La actividad de la TFDA de los liposomas de ZnPc es considerablemente mayor para la cepa sensible que para la MDR-*M. tuberculosis*. La pared celular de las micobacterias juega un papel importante en la patogenicidad. La naturaleza química y la impermeabilidad de la pared protegen a la micobacteria del daño de los medicamentos antituberculosos.<sup>41</sup> La diferencia observada entre las dos cepas puede estar

relacionada con la unión del liposoma de ZnPc y las bacterias. Se sabe que existen diferencias entre la morfología de la pared celular en MDR-*M. tuberculosis* y las bacterias susceptibles.<sup>42</sup> Kumar y *et al.* determinaron que la pared celular de MDR-*M. tuberculosis* es de mayor espesor que la cepa sensible en un 26,48%.<sup>41</sup> Esta diferencia morfológica podría afectar la permeabilidad de los fármacos y, en consecuencia, la eficacia de los fármacos antibacterianos.

Dado que la aplicación de fotosensibilizadores para la terapia en sitios pulmonares, se ha logrado para la terapia fotodinámica de carcinomas de pulmón usando fibra óptica para la administración de luz,<sup>43</sup> estas aplicaciones pulmonares podrían adaptarse para el tratamiento de la enfermedad de TB.

## 7.4 Conclusiones

La principal ventaja de TFD y TFDA es que el daño se limita al sitio de irradiación y al tejido circundante, minimizando los posibles efectos secundarios. Los ensayos de TFD en células de glioblastoma T98G, tanto con ZnPc como TAZnPc muestran una relación directa entre la fotoinactivación celular, la concentración y la dosis de luz administrada. Las Pcs vehiculizadas en liposomas mejoraron la eficacia de la TFD en células de glioblastoma respecto a las Pcs administradas en solución de DMF. Al comparar la efectividad de las dos formulaciones liposomales realizadas "A" y "B", para ZnPc, no se observaron diferencias; mientras que, para TAZnP se observó una leve diferencia en la actividad siendo menor en la formulación con mayor proporción de Pc/lípidos (TAZnPc<sub>A</sub>). Utilizando ZnPc, la formulación liposomal permite disminuir hasta 10 veces la concentración (de 0,5 a 0,05  $\mu\text{M}$ ), para obtener los mismos porcentajes de disminución de viabilidad celular, respecto a los ensayos realizados utilizando ZnPc en solución (DMF). Estos resultados sugieren que las ZnPcs administradas en liposomas podrían aplicarse como adyuvante en el tratamiento de glioblastoma.

En los ensayos de fotoinactivación de *M. tuberculosis* susceptible y MDR-*M. tuberculosis* la disminución en la viabilidad bacteriana fue por efecto del fotosensibilizador ZnPc, ya que los liposomas de control no generaron cambios en la viabilidad celular. En todos los casos, en la fotoinactivación se observó una dependencia entre el tiempo de incubación y la dosis de luz administrada. La cepa susceptible genera más de 3  $\log_{10}$  de reducción de UFC/mL después de 2 h de incubación con 75 J/cm<sup>2</sup> o 150 J/cm<sup>2</sup> de irradiación. Mientras que, para MDR-*M. tuberculosis*, fue necesario ajustar el tiempo de incorporación a

4 h y dosis de luz más altas para generar una disminución de 3 log<sub>10</sub> UFC/mL. La medicación convencional de MDR-*M. tuberculosis* tiene una eficacia limitada y el tratamiento de la TB resistente es mucho más complicado. Por lo tanto, la TFDA con liposomas de ZnPc podría ser una alternativa para tratar la MDR-*M. tuberculosis*, ya que se ha demostrado que genera *in vitro* una disminución de 3 log<sub>10</sub> UFC / mL o 99,9% de muerte bacteriana.

## 7.5 Materiales y Métodos

### 7.5.1 Pruebas *in vitro* en Células de glioblastoma

#### 7.5.1.1 *Fotosensibilizadores utilizados*

Los fotosensibilizadores utilizados fueron TAZnPc en DMF, TAZnPc<sub>A</sub>, TAZnPC<sub>B</sub>, ZnPc en DMF, ZnPc<sub>A</sub>, ZnPC<sub>B</sub>, sintetizados previamente como se detalló en el capítulo 2 y 6.

#### 7.5.1.2 *Fuente de luz*

La irradiación se realizó utilizando una lámpara halógena de cuarzo de 150 W / 21V, el espectro de la lámpara se muestra en la Figura 13 de la sección 4.5.2 del Capítulo 4. La luz se filtró a través de una cubeta de acrílico de 2,5 cm con agua para absorber el calor a 5 cm de lámpara. La muestra estuvo a 15,0 cm de la lámpara. Las dosis de luz de 10 y 27 J/cm<sup>2</sup>, corresponden a 14 y 38 min de irradiación, respectivamente. La dosis de luz se determinó utilizando un medidor de luz digital SE-9087 (Extech Instruments).

#### 7.5.1.3 *Condiciones de cultivo celular*

La línea celular de glioma T98G (ATCC American Type Culture Collection) se cultivó en DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SFB) y penicilina / estreptomina como antibiótico (Gibco) a 37 ° C en un incubador humidificado con atmósfera de dióxido de carbono al 5%.

#### 7.5.1.4 *Determinación de la viabilidad celular.*

La viabilidad celular se determinó usando el reactivo de viabilidad celular de alamarBlue (Invitrogen) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Las células se incubaron con el reactivo alamarBlue (10 µL) disuelto en 90 µL de DMEM complementado con 10% de SFB (volumen final: 100 µL en placa de 96 pocillos), durante 4 horas a 37°C. Las mediciones de fluorescencia se realizaron utilizando un lector de microplacas Biotek con una longitud de onda de excitación de 540–570 nm y la emisión de fluorescencia se lee a 580–610 nm.



#### 7.5.1.5 *Citotoxicidad en oscuridad*

Para evaluar la citotoxicidad de Pc en ausencia de irradiación, las células T98G se sembraron en placas de 96 pocillos (7000 células / pocillo) y se incubaron durante 24 horas en DMEM complementado con 10% de SFB más antibióticos. Luego, se reemplazó el medio y las células se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de Pcs en DMF y en liposomas disueltos en DMEM suplementado con 4% de SFB más antibióticos. Después de 18 horas de incubación, se descartó el medio y se determinó la viabilidad utilizando alamarBlue (Invitrogen) como se describió anteriormente.

#### 7.5.1.6 *Fotocitotoxicidad*

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 7000 células/pocillo y se cultivaron durante la noche a 37° en DMEM con 10% de SFB más antibióticos. El medio se reemplazó con DMEM suplementado con 4% de SFB que contenía el fotosensibilizador a la concentración deseada y las células se incubaron durante 18 horas a 37°C. Luego, el medio de cultivo se reemplazó con un 10% de medio DMEM suplementado con SFB y las células se irradiaron a la dosis de luz deseada (10 o 27 J/cm<sup>2</sup>). La viabilidad se examinó 24 horas después de la iluminación utilizando alamarBlue (Invitrogen) como se describió anteriormente y se expresó en referencia a las células de control (células no irradiadas sin Pc). Cada experimento se llevó a cabo en tres días diferentes, y los datos se expresaron como el promedio de todos los valores obtenidos ± error estándar.

### 7.5.2 *Pruebas in vitro en Mycobacterium tuberculosis*

#### 7.5.2.1 *Fotosensibilizadores utilizados*

El fotosensibilizador de tercera generación utilizado fue ZnPc<sub>A</sub> sintetizado previamente como se detalla en el capítulo 6.

#### 7.5.2.2 *Fuente de luz*

La fuente de luz visible utilizada fue una lámpara de 150W, el espectro de la lámpara se muestra en la Figura 13 de la sección 4.5.2 del Capítulo 4. Se filtró a través de una cubeta

de acrílico de 3,5 cm con agua para evitar la absorción de calor de la muestra. Las dosis de luz 30, 75 y 150 J/cm<sup>2</sup>, corresponden a 18, 45 y 90 min de irradiación, respectivamente. La dosis de luz se determinó utilizando un medidor de luz digital SE-9087 (Extech Instruments).

#### 7.5.2.3 *Ensayos de TFDA, determinación de fototoxicidad in vitro*

En todos los experimentos de inactivación fotodinámica, se usaron 1 mL de suspensiones celulares en agua estéril (10<sup>6</sup> UFC/mL). Se agregaron alícuotas de 1 mL de liposomas de ZnPc 20 µM o liposomas de control a 1 mL de suspensión de bacterias; la concentración final de Pc en el tubo fue de 10 µM o 5,76 µg/mL. Luego, las bacterias con liposomas se incubaron en la oscuridad a 37°C. El tiempo de incubación para ATCC 27294 fue de 2 h, mientras que para MDR-*M. tuberculosis* fue de 2 y 4 h.

Luego de la incubación, los cultivos se irradiaron y se tomaron muestras de 0,5 mL y se diluyeron en serie (1/10, 1/100, 1/1000) en agua estéril. Las unidades formadoras de colonias (UFC) en cada tubo se contaron después de 21, 28 y 40 días de incubación a 37°C utilizando L-J como medio de cultivo. Cada experimento se llevó a cabo tres días diferentes, y los datos se expresaron como el promedio de todos los valores obtenidos ± error estándar.

#### 7.5.2.4 *Experimentos control con liposomas blanco*

Para los experimentos de control de liposomas, las bacterias se incubaron con liposomas control, es decir, sin incorporarle la Pc y siguiendo el mismo protocolo que los ensayos de TFDA. Se incubaron los liposomas con ambas cepas de *M. tuberculosis* por 2 y 4 horas y se irradiaron con diferentes dosis de luz. Luego de la irradiación, se sembraron en tubo, utilizando medio de cultivo L-J y se contaron las UFC/mL a los 20, 28 y 40 días. Cada experimento se llevó a cabo tres días diferentes, y los datos se expresaron como el promedio de todos los valores obtenidos ± error estándar.

#### 7.5.2.5 *Experimentos control en oscuridad*

Para los experimentos de control en oscuridad, se siguió el mismo protocolo que se detalla en la sección 7.5.2.3 pero sin irradiación. Ambas cepas de *M. tuberculosis*, se

incubaron por 2 y 4 horas, con liposomas blanco y ZnPC<sub>A</sub> sin administrar ninguna dosis de luz. Posteriormente se sembraron en tubo, utilizando medio de cultivo L-J y se contaron las UFC/mL a los 21, 28 y 40 días. Cada experimento se llevó a cabo tres días diferentes, y los datos se expresaron como el promedio de todos los valores obtenidos  $\pm$  error estándar.

## 7.6 Bibliografía

1. Hamblin, M. R.; Huang, Y., *Handbook of photomedicine*. Taylor & Francis: **2013**.
2. Nomoto, T.; Nishiyama, N., Photodynamic therapy. In *Photochemistry for Biomedical Applications*, Springer: **2018**; pp 301-313.
3. Li, X.; Zheng, B.-D.; Peng, X.-H.; Li, S.-Z.; Ying, J.-W.; Zhao, Y.; Huang, J.-D.; Yoon, J., Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: Developments in the last five years. *Coordination Chemistry Reviews* **2019**, *379*, 147-160.
4. Skupin-Mrugalska, P.; Piskorz, J.; Goslinski, T.; Mielcarek, J.; Konopka, K.; Duzgunes, N., Current status of liposomal porphyrinoid photosensitizers. *Drug discovery today* **2013**, *18* (15-16), 776-784.
5. Kaneko, S.; Fujimoto, S.; Yamaguchi, H.; Yamauchi, T.; Yoshimoto, T.; Tokuda, K., Photodynamic Therapy of Malignant Gliomas. *Progress in neurological surgery* **2018**, *32*, 1-13.
6. Silva, E.; Franchi, L.; Tedesco, A., Chloro-aluminium phthalocyanine loaded in ultradeformable liposomes for photobiology studies on human glioblastoma. *RSC Advances* **2016**, *6* (83), 79631-79640.
7. Krakstad, C.; Chekenya, M., Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Molecular cancer* **2010**, *9*, 135.
8. García, A. M.; de Alwis Weerasekera, H.; Pitre, S. P.; McNeill, B.; Lissi, E.; Edwards, A. M.; Alarcon, E. I., Photodynamic performance of zinc phthalocyanine in HeLa cells: A comparison between DPCC liposomes and BSA as delivery systems. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **2016**, *163*, 385-390.
9. García, A. M.; Alarcon, E.; Munoz, M.; Scaiano, J. C.; Edwards, A. M.; Lissi, E., Photophysical behaviour and photodynamic activity of zinc phthalocyanines associated to liposomes. *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **2011**, *10* (4), 507-514.
10. Huang, L.; Wei, G.; Sun, X.; Jiang, Y.; Huang, Z.; Huang, Y.; Shen, Y.; Xu, X.; Liao, Y.; Zhao, C., A tumor-targeted Ganetespib-zinc phthalocyanine conjugate for synergistic chemo-photodynamic therapy. *European journal of medicinal chemistry* **2018**, *151*, 294-303.
11. Weijer, R.; Broekgaarden, M.; Kos, M.; van Vught, R.; Rauws, E. A. J.; Breukink, E.; van Gulik, T. M.; Storm, G.; Heger, M., Enhancing photodynamic therapy of refractory solid cancers: Combining second-generation photosensitizers with multi-targeted liposomal delivery. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2015**, *23*, 103-131.
12. Bellavance, M. A.; Poirier, M. B.; Fortin, D., Uptake and intracellular release kinetics of liposome formulations in glioma cells. *International journal of pharmaceutics* **2010**, *395* (1-2), 251-259.
13. Dai, T.; Tegos, G. P.; Zhiyentayev, T.; Mylonakis, E.; Hamblin, M. R., Photodynamic therapy for methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection in a mouse skin abrasion model. *Lasers in surgery and medicine* **2010**, *42* (1), 38-44.
14. Barra, F.; Roschetto, E.; Soriano, A. A.; Vollaro, A.; Postiglione, I.; Pierantoni, G. M.; Palumbo, G.; Catania, M. R., Photodynamic and Antibiotic Therapy in Combination to Fight Biofilms and Resistant Surface Bacterial Infections. *International journal of molecular sciences* **2015**, *16* (9), 20417-20430.
15. Liu, Y.; Qin, R.; Zaat, S. A. J.; Breukink, E.; Heger, M., Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. *Journal of clinical and translational research* **2015**, *1* (3), 140-167.
16. *Global tuberculosis report 2018*. Geneva: World Health Organization 2018; .

17. *Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis*; Geneva: World Health Organization: **2017**;
18. Rodriguez-Rivera, F. P.; Zhou, X.; Theriot, J. A.; Bertozzi, C. R., Visualization of mycobacterial membrane dynamics in live cells. *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139* (9), 3488-3495.
19. Pezzella, A. T., History of Pulmonary Tuberculosis. *Thoracic surgery clinics* **2019**, *29* (1), 1-17.
20. Glaziou, P.; Floyd, K.; Korenromp, E. L.; Sismanidis, C.; Bierrenbach, A. L.; Williams, B. G.; Atun, R.; Raviglione, M., Lives saved by tuberculosis control and prospects for achieving the 2015 global target for reducing tuberculosis mortality. *Bulletin of the World Health Organization* **2011**, *89* (8), 573-582.
21. Gygli, S. M.; Borrell, S.; Trauner, A.; Gagneux, S., Antimicrobial resistance in Mycobacterium tuberculosis: mechanistic and evolutionary perspectives. *FEMS microbiology reviews* **2017**, *41* (3), 354-373.
22. Sung, N.; Back, S.; Jung, J.; Kim, K. H.; Kim, J. K.; Lee, J. H.; Ra, Y.; Yang, H. C.; Lim, C.; Cho, S.; Kim, K.; Jheon, S., Inactivation of multidrug resistant (MDR)- and extensively drug resistant (XDR)-Mycobacterium tuberculosis by photodynamic therapy. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **2013**, *10* (4), 694-702.
23. Bredikhin, D.; Nikonov, S.; Cherednichenko, A.; Petrenko, T., In vitro photodynamic inactivation of mycobacterium tuberculosis by radahlorin. *Tuberculosis and Lung Diseases* **2018**, *96* (1), 5-10.
24. Lin, H.; Chen, J.; Zhang, Y.; Ulla, A.; Liu, J.; Lin, F.; Jiang, L.; Huang, M., Enhanced anti-microbial effect through cationization of a mono-triazatricyclodecane substituted asymmetric phthalocyanine. *Journal of inorganic biochemistry* **2018**, *189*, 192-198.
25. Miretti, M.; Clementi, R.; Tempesti, T. C.; Baumgartner, M. T., Photodynamic inactivation of multiresistant bacteria (KPC) using zinc(II)phthalocyanines. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2017**, *27* (18), 4341-4344.
26. van Leengoed, H. L.; Cuomo, V.; Versteeg, A. A.; van der Veen, N.; Jori, G.; Star, W. M., In vivo fluorescence and photodynamic activity of zinc phthalocyanine administered in liposomes. *British journal of cancer* **1994**, *69* (5), 840-845.
27. Yin, R.; Agrawal, T.; Khan, U.; Gupta, G. K.; Rai, V.; Huang, Y. Y.; Hamblin, M. R., Antimicrobial photodynamic inactivation in nanomedicine: small light strides against bad bugs. *Nanomedicine (London, England)* **2015**, *10* (15), 2379-2404.
28. Chen, C.; Chen, C.; Yang, J.; Tsai, T., Liposome-encapsulated photosensitizers against bacteria. *Recent patents on anti-infective drug discovery* **2013**, *8* (2), 100-107.
29. Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R., Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **2004**, *1* (4), 279-293.
30. Lee, L. K.; Whitehurst, C.; Pantelides, M. L.; Moore, J. V., In situ comparison of 665 nm and 633 nm wavelength light penetration in the human prostate gland. *Photochemistry and photobiology* **1995**, *62* (5), 882-886.
31. Fabris, C.; Valduga, G.; Miotto, G.; Borsetto, L.; Jori, G.; Garbisa, S.; Reddi, E., Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer research* **2001**, *61* (20), 7495-7500.
32. Soriano, J.; Villanueva, A.; Stockert, J. C.; Canete, M., Vehiculization determines the endocytic internalization mechanism of Zn(II)-phthalocyanine. *Histochemistry and cell biology* **2013**, *139* (1), 149-160.

33. Soriano, J.; Villanueva, A.; Stockert, J.; Cañete, M., Regulated necrosis in HeLa cells induced by ZnPc photodynamic treatment: A new nuclear morphology. *International journal of molecular sciences* **2014**, *15* (12), 22772-22785.
34. Jamieson, F. B.; Guthrie, J. L.; Neemuchwala, A.; Lastovetska, O.; Melano, R. G.; Mehaffy, C., Profiling of rpoB mutations and MICs for rifampin and rifabutin in Mycobacterium tuberculosis. *Journal of clinical microbiology* **2014**, *52* (6), 2157-2162.
35. Grinholc, M.; Szramka, B.; Kurlenda, J.; Graczyk, A.; Bielawski, K. P., Bactericidal effect of photodynamic inactivation against methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus is strain-dependent. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **2008**, *90* (1), 57-63.
36. Bertoloni, G.; Rossi, F.; Valduga, G.; Jori, G.; Ali, H.; van Lier, J. E., Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on prokaryotic and eukaryotic microbial cells. *Microbios* **1992**, *71* (286), 33-46.
37. Md, S.; Haque, S.; Madheswaran, T.; Zeeshan, F.; Meka, V. S.; Radhakrishnan, A. K.; Kesharwani, P., Lipid based nanocarriers system for topical delivery of photosensitizers. *Drug discovery today* **2017**, *22* (8), 1274-1283.
38. Ribeiro, A. P.; Andrade, M. C.; Bagnato, V. S.; Vergani, C. E.; Primo, F. L.; Tedesco, A. C.; Pavarina, A. C., Antimicrobial photodynamic therapy against pathogenic bacterial suspensions and biofilms using chloro-aluminum phthalocyanine encapsulated in nanoemulsions. *Lasers in medical science* **2015**, *30* (2), 549-559.
39. Ferro, S.; Ricchelli, F.; Mancini, G.; Tognon, G.; Jori, G., Inactivation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) by liposome-delivered photosensitising agents. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **2006**, *83* (2), 98-104.
40. Dua, K.; Rapalli, V. K.; Shukla, S. D.; Singhvi, G.; Shastri, M. D.; Chellappan, D. K.; Satija, S.; Mehta, M.; Gulati, M.; Pinto, T. J. A.; Gupta, G.; Hansbro, P. M., Multi-drug resistant Mycobacterium tuberculosis & oxidative stress complexity: Emerging need for novel drug delivery approaches. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **2018**, *107*, 1218-1229.
41. Kumar, K.; Sagar, B. K. C.; Giribhattanavar, P.; Patil, S. A., Ultrastructural analysis of cell wall of drug resistant and sensitive Mycobacterium tuberculosis isolated from cerebrospinal fluid by transmission electron microscope. *Microscopy research and technique* **2019**, *82* (2), 122-127.
42. Velayati, A. A.; Farnia, P.; Ibrahim, T. A.; Haroun, R. Z.; Kuan, H. O.; Ghanavi, J.; Farnia, P.; Kabarei, A. N.; Tabarsi, P.; Omar, A. R.; Varahram, M.; Masjedi, M. R., Differences in cell wall thickness between resistant and nonresistant strains of Mycobacterium tuberculosis: using transmission electron microscopy. *Chemotherapy* **2009**, *55* (5), 303-307.
43. Okunaka, T.; Kato, H.; Tsutsui, H.; Ishizumi, T.; Ichinose, S.; Kuroiwa, Y., Photodynamic therapy for peripheral lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* **2004**, *43* (1), 77-82.

---

## Capítulo 8

---

### Conclusiones generales, proyecciones y producción científica

8.1	Conclusiones Generales.....	179
8.2	Proyecciones .....	183
8.3	Producción Científica.....	184





## 8.1 Conclusiones Generales

La terapia fotodinámica (TFD) ha surgido en los últimos años como una alternativa de tratamiento para varios tipos de cáncer y enfermedades microbianas, uso de diagnóstico y cosmético. La TFD implica la administración conjunta de un fotosensibilizador (PS) y luz que conducen a la generación de especies reactivas de oxígeno, produciendo daños en los componentes celulares desencadenando muerte celular. Una de las principales ventajas de la TFD, es que el sitio de acción se limita al área afectada que se ha irradiado.

El desarrollo de PSs que sean más eficientes y presenten menos efectos adversos que los existentes es un gran desafío. Las ftalocianinas son fotosensibilizadores de segunda generación con gran potencial de aplicación en TFD.

El objetivo General de esta tesis Doctoral fue “Sintetizar y caracterizar Zn-ftalocianinas. Analizar el efecto de los compuestos obtenidos con distintos sustituyentes y su incorporación en vesículas liposomales en aplicaciones en terapia fotodinámica *in vitro*.” Para ello, inicialmente, se abordó la síntesis de ftalocianinas, comenzando con la síntesis ftalonitrilos y subftalocianinas como precursores. Los rendimientos de reacción de los ftalonitrilos fueron de buenos a moderados. Las subftalocianinas como precursores de Pcs asimétricas se obtuvieron con buenos rendimientos. A partir de estos productos, se sintetizaron 12 ftalocianinas (ver Figura 1), lográndose diversidad estructural con número y tipo de sustituyentes diferentes, como así también, en algunos casos moléculas con carga.

Las diversas Pcs presentaron  $\lambda_{\text{máx}}$  de absorción y emisión diferentes entre sí, dependiendo el tipo y número de sustituyentes que poseían, todas ellas dentro del rango de la ventana fototerapéutica. El rendimiento cuántico de oxígeno singlete de las Pcs ensayadas mostraron resultados similares a ZnPc, considerada como referencia, lo que indica un potencial uso como PSs en TFD.

Posteriormente se realizaron los ensayos *in vitro*. Para evaluar TFDA utilizando las Pcs como PSs de segunda generación, es decir, en solución de DMF, se seleccionaron tres Pcs: una neutra, liposoluble y dos catiónicas una liposoluble, la otra hidrosoluble. Los ensayos se realizaron en dos bacterias Gram-negativas, *E. coli* multisensible y *K.pneumonie* productora de carbapensemasas. Las Pcs catiónicas tuvieron mayor actividad que las neutras frente a las bacterias Garm-negativas. Ambas Pcs catiónicas mostraron actividad frente a *E. coli*; en cambio, *K. pneumonie* productora de carbapenemasas se vio afectada sólo por la Pc catiónica soluble en agua.

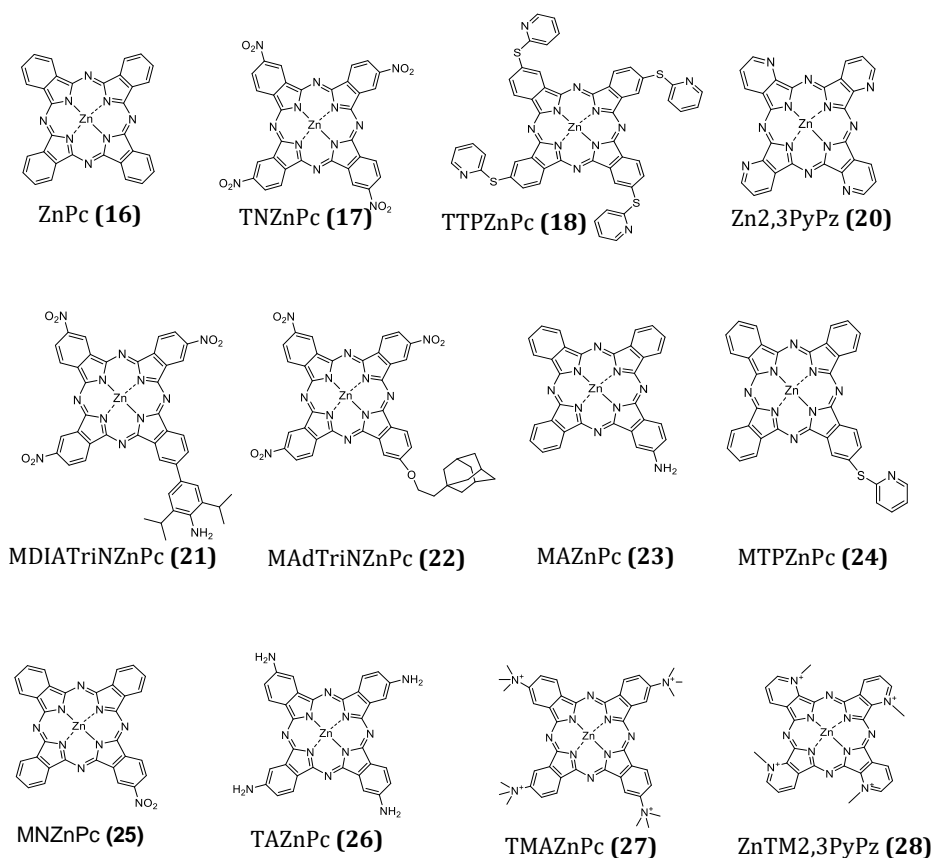


Figura 1.

Los ensayos *in vitro* utilizando Pcs en solución de DMF para evaluar la TFD en células de glioblastoma T98G, arrojó resultados prometedores, ya que se determinó que las dos Pcs ensayadas, redujeron la viabilidad celular en un 90%. Los ensayos para determinar el mecanismo de muerte celular dieron como resultado que ambas Pcs desencadenan apoptosis como principal vía de muerte; y, si se tiene en cuenta, además la no retención de la capacidad proliferativa de las células (ensayos clonogénicos) post tratamiento de TFD, hace de las Pcs moléculas aún más atractivas para su utilización como agentes contra el cáncer. La obtención de resultados similares en los ensayos de muerte celular frente otras líneas de glioblastoma (MO59, LN229 y U87MG), destacan su potencial uso en más de una línea celular.

Los fotosensibilizadores de tercera generación, es decir aquellos de segunda generación vehiculizados o dirigidos a ciertos sitios específicos, constituyen una promesa para la TFD y TFDA. Es un campo poco estudiado por lo que constituye un terreno propicio para la investigación y el desarrollo de nuevas formulaciones para mejorar las terapias actuales.

La incorporación de dos Pcs en liposomas, mejorando la metodología reportada, se realizó de manera eficiente. Los espectros de absorción y emisión de las Pcs incorporadas en liposomas no se ven afectados en un medio acuoso como PBS. El tamaño de los liposomas es el parámetro que más se afectó tanto en la estabilidad a corto como a largo plazo. Los estudios fotofísicos en medio de cultivo muestran mejoras respecto a las Pcs no incorporadas en liposomas.

Por último, se evaluó la utilización de Pcs incorporadas en liposomas como PSs de tercera generación en TFD y TFDA. Los ensayos de TFD en células de glioblastoma, revelaron que la formulación liposomal permite disminuir la concentración de Pcs administradas hasta 10 veces, respecto a las Pcs no incorporadas (en solución). Estos resultados son de gran interés, ya que permite reducir la dosis a administrar y, por consiguiente, disminuir los posibles efectos adversos.

Los ensayos de TFDA utilizando ZnPc incorporada en liposomas, presentaron fotoinactivación de *M. tuberculosis* susceptible y MDR-*M. tuberculosis*, aunque, las condiciones para generar la disminución en la viabilidad de la cepa resistente fueron más drásticas que la sensible (mayor tiempo de incubación y mayor dosis de irradiación). Teniendo presente que el tratamiento de la TB resistente es complicado, estos resultados en TFDA con liposomas de ZnPc podría ser una alternativa para tratar la MDR-*M. tuberculosis*.



## 8.2 Proyecciones

A lo largo de este trabajo de tesis, se desarrollaron y estudiaron ftalocianinas como fotosensibilizadores de segunda y tercera generación y su aplicación *in vitro* en Terapia Fotodinámica y Terapia Fotodinámica Antimicrobiana. Los resultados obtenidos en TFD son prometedores, teniendo en cuenta la capacidad de disminuir la viabilidad celular por apoptosis y la casi nula capacidad clonogénica que poseen las células post tratamiento. Además de la relevancia que tiene una línea celular de un tipo de cáncer devastador y frecuente en la población adulta (glioblastoma), cuyo actual tratamiento no es del todo efectivo debido a las limitaciones que posee la zona a tratar, pudiendo utilizarse como una terapia adyuvante para el tratamiento de esta patología. En cuanto a la TFDA, considerando las grandes dificultades que se presentan en los tratamientos de infecciones causadas por bacterias multirresistentes en donde los antibióticos convencionales dejan de ser efectivos, los resultados obtenidos en TFDA son de gran relevancia. Sin embargo, la búsqueda de nuevos PS efectivos que permitan optimizar el uso en la menor concentración posible, disminuyendo los efectos adversos continúa siendo un desafío.

En el área de la TFD, se puede abarcar desde el diseño de nuevas moléculas de ftalocianinas, hasta el desarrollo de nuevas formulaciones con posibilidad de dirigir el PS a un objetivo en particular. Como la TFD se limita al sitio de irradiación, sería muy interesante investigar otros tipos de cáncer en donde la iluminación llegue sin inconvenientes como lo es el caso de melanomas o cáncer de cuello de útero.

El campo de la TFDA no ha sido muy explorado, sumado a esto, el constante aumento de microorganismos multirresistentes lo hace muy atractivo para el estudio y diseño de nuevas terapias. La presencia de cargas modifica la actividad de los fotosensibilizadores, en base a esto, podrían investigarse formulaciones liposomales compuestas por lípidos con extensión de cadena variable y lípidos con carga neta (catiónicos o aniónicos), a fin de optimizar la vehiculización de las ftalocianinas.

### 8.3 Producción Científica

El desarrollo de esta tesis doctoral permitió la publicación de tres trabajos, y un cuarto que se encuentra bajo revisión, en revistas científicas internacionales con referato.

Los resultados obtenidos y desarrollados en el Capítulo 4 se publicaron en:

Miretti, M.; Clementi, R.; Tempesti, T. C.; Baumgartner, M. T., Photodynamic inactivation of multiresistant bacteria (KPC) using zinc(II)phthalocyanines. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2017, 27 (18), 4341-4344.

Los resultados obtenidos y desarrollados en el Capítulo 5 se publicaron en:

Velazquez, F. N.; Miretti, M.; Baumgartner, M. T.; Caputto, B. L.; Tempesti, T. C.; Prucca, C. G., Effectiveness of ZnPc and of an amine derivative to inactivate Glioblastoma cells by Photodynamic Therapy: an in vitro comparative study. *Scientific reports* 2019, 9 (1), 3010.

Los resultados obtenidos y desarrollados en el Capítulo 7 correspondientes a *M. tuberculosis* se publicaron en:

Miretti, M.; Juri, L.; Cosiansi, M. C.; Tempesti, T. C.; Baumgartner, M. T., Antimicrobial Effects of ZnPc Delivered into Liposomes on Multidrug Resistant (MDR)-Mycobacterium tuberculosis. *ChemistrySelect* 2019, 4 (33), 9726-9730.

Los resultados obtenidos y desarrollados en el Capítulo 7 correspondientes a glioblastomas se publicaron en:

Miretti, M.; Tempesti, T. C.; Prucca, C. G.; Baumgartner, M. T., Zn phthalocyanines loaded into liposomes: Characterization and enhanced performance of photodynamic activity on glioblastoma cells. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2020, 28 (7), 115355.

Además, se realizaron 9 presentaciones a congresos nacionales e internacionales en:

XXII Simposio Nacional de Química Orgánica 2019

Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias 2017

XIII Encuentro Latinoamericano de Fotoquímica y Fotobiología 2017

XXI Simposio Nacional de Química Orgánica 2017

LII Reunión SAIB 2016

LI Reunión SAIB 2015

XX Simposio Nacional de Química Orgánica 2015

XI Congreso Argentino de Microbiología General 2015

