

1 2 3

OCHOA, LAURA

Síntesis y actividad fotocatalítica de Polioxivinonas artificiales en sistemas típicos

2015 **74396**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

Departamento de Química

TESIS DOCTORAL

Doctorado en Ciencias Químicas

***SÍNTESIS Y ACTIVIDAD FOTODINÁMICA DE
FTALOCIANINAS ANFIFÍLICAS EN SISTEMAS
BIOMIMÉTICOS***

Lic. A. Laura Ochoa

Año 2015



743 6

MFN:
Clasif:
T. 977

Dirección de Tesis

DIRECTOR: Dr. Edgardo N. Durantini

CO-DIRECTORA: Dra. M. Elisa Milanesio



Jurado de Tesis

Dra. Stella Maris Chiacchiera

Dra. Mariana Adela Fernandez

Dra. Fabiana D' Eramo



Doctorando

Lic. Ana Laura Ochoa



Agradecimientos

A la UNRC, CONICET y el Ministerio de Ciencia y Tecnología por brindarme los recursos necesarios para llevar adelante mis estudios de postgrado.

A mi director Edgardo y co-directora Elisa, por haberme dado la oportunidad de trabajar y aprender con ellos, por estar siempre presentes y predispuestos a brindar ayuda.

A los jurados de tesis: Dra. Stella Maris Chiacchiera, Dra. Mariana Adela Fernandez, Dra. Fabiana D' Eramo, por dedicar tiempo para corregir y mejorar este trabajo.

A mis hermanas Luciana y Andrea, por su apoyo incondicional, a mis padres por haberme acompañado siempre y a mis sobrinas.

A los integrantes del grupo de investigación, por su colaboración y amistad.

A mis compañeros del gran becario, por el apoyo, la compañía, los consejos y los bellos momentos compartidos a lo largo de estos años.

Resumen

Las ftalocianinas han sido propuestas como fotosensibilizadores para el tratamiento de enfermedades neoplásicas mediante terapia fotodinámica (PDT) y la inactivación fotodinámica (PDI) de microorganismos. Por lo tanto, en este trabajo de Tesis se sintetizaron ftalocianinas con diferentes patrones de sustitución en la periferia del macrociclo como agentes fototerapéuticos. Las ftalocianinas con simetría A_3B se obtuvieron mediante la reacción de expansión del anillo de las correspondientes subftalocianinas. Mientras que las ftalocianinas con simetría A_4 se formaron a partir de la reacción de ciclotetramerización del ftalonitrilo. De esta manera, los derivados de zinc(II) ftalocianinas se sustituyeron por grupos que permiten obtener fotosensibilizadores con diferente carácter anfifílico, lo que permite una mejor interacción con el medio biológico.

Los estudios espectroscópicos de las ftalocianinas muestran una banda de absorción intensa en la ventana fototerapéutica, con emisión de fluorescencia en la región roja del espectro. Además, presentan una actividad fotodinámica eficiente en medios homogéneos y sistemas biomiméticos.

Cuando se utilizan glóbulos rojos como modelo celular, las ftalocianinas conteniendo una unidad de adamantano ($AZnPc$ y AN_3ZnPc^{3+}) son las más activas para producir la fotohemólisis. Estos resultados indican que $AZnPc$ y AN_3ZnPc^{3+} muestran aplicaciones potenciales como agentes fotosensibilizadores para el tratamiento de PDT.

Además, la ftalocianina tetracatiónica P_4ZnPc^{4+} , la cual posee cuatro grupos piridinio, y la ftalocianina tricatiónica FN_3ZnPc^{3+} , sustituida por tres grupos anilinio y un anillo perfluorado, son efectivas para la fotoinactivación de *C. albicans* en suspensiones celulares. Por lo tanto, los estudios de las propiedades espectroscópicas, la actividad fotodinámica y los ensayos *in vitro* de los fotosensibilizadores muestran que estas ftalocianinas son apropiadas para producir un impulso importante en el desarrollo de nuevas opciones fototerapéuticas.

Abstract

Phthalocyanines have been proposed as photosensitizers for the treatment of neoplastic diseases by photodynamic therapy (PDT) and photodynamic inactivation (PDI) of microorganisms. Therefore, in this work phthalocyanines were synthesized with different substitution patterns on the periphery of the macrocycle as phototherapeutic agents. AB₃ symmetrical phthalocyanines were obtained by ring expansion reaction of the corresponding subphthalocyanines. While phthalocyanines with symmetry A₄ were formed from the reaction of the phthalonitrile cyclotetramerization. Thus, derivatives of zinc (II) phthalocyanine were substituted by groups which can obtain photosensitizers with different amphiphilic character, which allows better interaction with the biological medium.

Spectroscopic studies of phthalocyanines show a strong absorption band in the phototherapeutic window, with fluorescence emission in the red region of the spectrum. Also, they present an efficient photodynamic activity in homogeneous media and biomimetic systems.

When red blood cells were used as a cell model, phthalocyanines containing adamantane unit (AZnPc and AN₃ZnPc³⁺) are the most active for producing the photohemolysis. These results indicate that AZnPc and AN₃ZnPc³⁺ indicate potential applications as photosensitizers for PDT treatment.

Moreover, phthalocyanine tetracationic P₄ZnPc⁴⁺, which has four pyridinium groups, and phthalocyanine tricationic FN₃ZnPc³⁺, substituted by three groups anilinium and a perfluorinated ring, are effective for the photoinactivation of *C. albicans* cell suspensions. Therefore, studies of the spectroscopic properties, and the photodynamic activity of photosensitizers *in vitro* tests show that these phthalocyanines are appropriate to produce a significant boost in the development of new phototherapeutic options.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Antecedentes de la Terapia fotodinámica.....	1
1.2. Terapia Fotodinámica.....	3
1.3. Procesos fotodinámicos.....	5
1.4. Fotosensibilizadores.....	7
1.5. Ftalocianinas.....	9
1.5.1. Características generales de las ftalocianinas.....	9
1.5.2. Síntesis de las ftalocianinas.....	10
1.5.3. Características espectroscópicas y fotoquímicas.....	15
1.5.4. Formación de agregados.....	17
1.6. Inactivación fotodinámica de microorganismos.....	18
1.6.1. Control de enfermedades infecciosas.....	18
1.6.2. Efecto fotodinámico en los microorganismos.....	20
1.7. Inactivación fotodinámica de <i>Candida albicans</i>	23
1.7.1. Hongos.....	23
1.7.2. Levaduras.....	23
1.7.3. <i>Candida albicans</i>	24
1.7.4. Candidiasis.....	25
1.7.5. Agentes antifúngicos.....	26
1.7.6. Mecanismo de la fotoinactivación a nivel celular.....	27
1.8. Glóbulos rojos.....	28
1.8.1. Características generales de los eritrocitos.....	28
1.8.2. Eritrocitos como modelo de células para estudios de la PDT.....	30
2. Objetivos.....	33
2.1. Objetivo general.....	33
2.2. Objetivos específicos.....	33

3. Materiales y Métodos	35
3.1. Reactivos y Equipamiento General	35
3.2. Ftalocianinas.....	36
3.2.1. Síntesis de ftalocianinas	36
3.2.2. Preparación de soluciones de ftalocianinas.....	42
3.3. Estudios espectroscópicos	42
3.4. Sistemas de irradiación.....	43
3.5. Fotooxidación de 9,10-dimetilantraceno	44
3.6. Fotooxidación del azul nitro-tetrazolio	47
3.7. Ensayos en <i>Candida albicans</i>	47
3.7.1. Cultivos de la cepa fúngica	47
3.7.2. Inactivación fotodinámica de <i>C. albicans</i>	48
3.7.3. Unión del sensibilizador a las células de <i>C. albicans</i>	48
3.7.4. Efecto fotosensibilizado sobre la curva de crecimiento de <i>C. albicans</i>	50
3.8. Ensayos en glóbulos rojos	51
3.8.1. Preparación de las suspensiones de glóbulos rojos	51
3.8.2. Fotohemólisis	52
3.8.3. Fragilidad osmótica.....	53
3.8.4. Mecanismo de acción fotodinámica en glóbulos rojos	53
4. Resultados y Discusión	55
4.1. <i>Estudios de AZnPc, A₄ZnPc y M₄ZnPc</i>	55
4.1.1. Síntesis de ftalocianinas	55
4.1.2. Estudios espectroscópicos.....	57
4.1.3. Actividad fotodinámica.....	61
4.1.3.1. Medio homogéneo	62
4.1.3.2. Medio microheterogéneo.....	63
4.1.4. Estudios en <i>Candida albicans</i>	66
4.1.5. Ensayos en globulos rojos.....	67
4.1.5.1. Fotohemólisis de glóbulos rojos por ftalocianinas.....	67
4.1.5.2. Resistencia osmótica de glóbulos rojos tratados con ftalocianinas.....	71

4.1.5.3. Mecanismo de fotohemólisis de glóbulos rojos por ftalocianinas	74
4.2. Estudios de $PZnPc$ y $PZnPc^+$ y P_4ZnPc^{4+}	78
4.2.1. Síntesis de ftalocianinas	78
4.2.2. Estudios espectroscópicos	80
4.2.3. Actividad fotodinámica	82
4.2.3.1. Medio homogéneo	83
4.2.3.2. Medio microheterogéneo	84
4.2.3.3. Producción de $O_2^{\cdot -}$ en medio microheterogeneo	86
4.2.4. Estudios en <i>Candida albicans</i>	87
4.2.4.1. PDI de suspensiones celulares de <i>C. albicans</i>	87
4.2.4.2. Unión de las ftalocianinas a células de <i>C. albicans</i>	89
4.2.4.3. Efecto fotosensibilizado en la curva de crecimiento de <i>C. albicans</i> ...	90
4.2.5. Ensayos en globulos rojos	92
4.3. Estudios de AN_3ZnPc^{3+} , TN_3ZnPc^{3+} y FN_3ZnPc^{3+}	92
4.3.1. Síntesis de ftalocianinas	92
4.3.2. Estudios espectroscópicos	98
4.3.3. Actividad fotodinámica	102
4.3.3.1. Medio homogéneo	104
4.3.3.2. Medio microheterogéneo	106
4.3.4. Estudios en <i>Candida albicans</i>	106
4.3.4.1. PDI de suspensiones celulares de <i>C. albicans</i>	106
4.3.4.2. Unión de las ftalocianinas a células de <i>C. albicans</i>	108
4.3.4.3. Efecto fotosensibilizado en la curva de crecimiento de <i>C. albicans</i> .	109
4.3.5. Ensayos en globulos rojos	110
4.3.5.1. Fotohemólisis de glóbulos rojos por ftalocianinas	110
5. Conclusiones	115
5.1. Ftalocianinas neutras $AZnPc$ y A_4ZnPc	115
5.2. Ftalocianinas catiónicas $PZnPc^+$ y P_4ZnPc^{4+}	117
5.3. Ftalocianinas tricatiónicas TN_3ZnPc^{3+} , AN_3ZnPc^{3+} y FN_3ZnPc^{3+}	118
6. Glosario de Abreviaturas y Símbolos	121

7. Glosario de Moléculas Estudiadas	125
8. Referencias	131

1. INTRODUCCIÓN



1. Introducción

1.1. Antecedentes de la Terapia fotodinámica

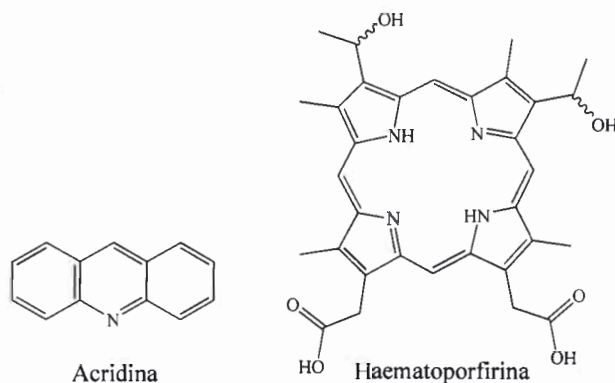
La cura de algunas enfermedades por medio de la luz se conoce desde la antigüedad [1]. Las culturas de Egipto, China, India y Grecia, más de tres mil años antes de la era moderna, trataban el raquitismo, entre otras enfermedades, mediante baños de sol (helioterapia) [2]. Las técnicas fueron evolucionando en la India y Egipto en el siglo XIV a. C. con la administración de extractos de plantas que contienen psoralenos, a enfermos de psoriasis y vitiligo en combinación con la exposición a la luz solar [3]. A finales del siglo XVIII los médicos abordaron científicamente el estudio de los efectos beneficiosos de la exposición solar para el tratamiento de diversas enfermedades. En la actualidad, la fototerapia es una tecnología médica bien establecida, con aplicaciones diversas [4].

Las primeras investigaciones científicas sobre fotoquimioterapia fueron los estudios experimentales de Oscar Raab, un estudiante de medicina de la Universidad de Ludwig-Maximilliam, (Múnich, Alemania) y discípulo de von Tappeiner. En 1898, Raab observó la toxicidad de pequeñas concentraciones de colorantes de acridina (Esquema 1) frente al protozoo de vida libre *Paramecium caudatum* [1]. Estos resultados se publicaron hacia 1900 y Hermann von Tappeiner junto a Albert Jesionek propusieron varias aplicaciones dermatológicas para estas sustancias. El trabajo puso de relieve la existencia del fenómeno de la fotosensibilización, es decir, la producción de daño celular inducido por la acción combinada de luz y ciertas sustancias fluorescentes.

En 1904, von Tappeiner y Jodlbauer relacionaron la fotosensibilización con la presencia de oxígeno y llamaron a este fenómeno "*acción fotodinámica*" para distinguirla de la fotosensibilización fotográfica [5]. Dichos investigadores fueron pioneros en la aplicación de un fotosensibilizador sobre tumores. A partir de este momento se introdujo la denominación de terapia fotodinámica (PDT) del cáncer, técnica que combina la acción de la luz sobre un fármaco fotosensibilizador y oxígeno, para fotooxidar biomoléculas de las células tumorales y producir su muerte de forma selectiva [6].

El fenómeno captó el interés de los científicos y los experimentos se extendieron en diferentes medios biológicos. Hasselbach demostró hacia 1909, que la fotorreacción ocurría sólo en presencia del oxígeno, confirmando lo planteado por H. von Tappeiner. En 1912,

Hans Fischer, demostró que la Haematoporfirina (Esquema 1), que se obtiene de la sangre, producía un fuerte efecto fotodinámico en los ratones.



Esquema 1. Estructura química de acridina y Haematoporfirina

El experimento más destacado fue el de Friedrich Meyer-Betz, físico austriaco, que trabajaba en la clínica rusa de Königsberd (Kaliningrad, en la actualidad). Meyer-Betz, se inyectó a sí mismo 200 mg de Haematoporfirina por vía intravenosa. Un fuerte cosquilleo y sensación de quemazón se produjo en las regiones de su cuerpo expuestas a la luz del sol, principalmente la cara y las manos. La piel se le puso roja y se hinchó en las áreas afectadas (Figura 1). Varias semanas después el efecto de fotosensibilización aún persistía, aunque en menor medida. De esta manera Meyer-Betz demostró drásticamente el efecto de los fotosensibilizadores en humanos. Años más tarde se supo que las *porfirias*, un grupo de enfermedades asociadas con problemas en la biosíntesis del grupo hemo, dejaban libre porfirinas despojadas de hierro en el torrente sanguíneo, que al llegar a la piel permitían la fotosensibilización [1]. Posteriormente se encontró que otras afecciones de la piel que generaban sensibilidad a la luz, se debían a la presencia de alguna molécula que producía el efecto fotodinámico [7].

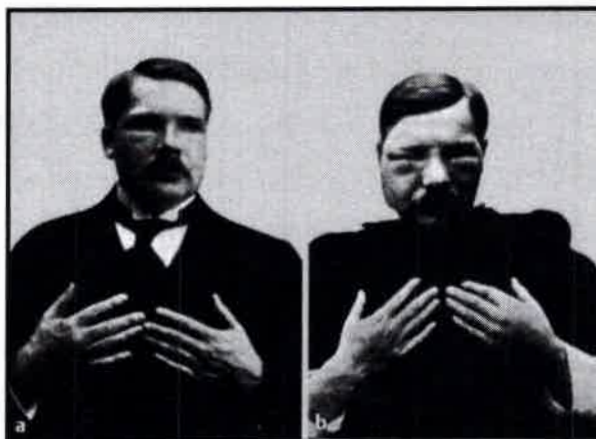


Figura 1. Friedrich Meyer-Betz, físico austriaco, demostró el efecto fotodinámico en humanos. (a) Luego de inyectarse 200 mg de Haematoporfirina por vía intravenosa. (b) Dos días más tarde y luego de exponerse al sol, la fotosensibilización tuvo lugar. Las regiones de su cuerpo expuestas a la luz solar (principalmente la cara y las manos) mostraron enrojecimiento e hinchazón [7].

En la actualidad, a un siglo de su descubrimiento, las investigaciones sobre el efecto fotodinámico y las estructuras moleculares que lo producen, han permitido el desarrollo de líneas de investigación basadas en este fenómeno que se extienden desde aplicaciones terapéuticas y el perfeccionamiento de la síntesis de derivados de los sensibilizadores naturales hasta la transformación de energía. La investigación y el desarrollo de agentes fototerapéuticos para el tratamiento de tumores neoplásicos, han dado lugar en las últimas décadas a la aplicación de fotosensibilizadores para el tratamiento de infecciones y esterilización de diferentes medios [8,9]. Una gran variedad de compuestos derivados del anillo tetrapirrólico han demostrado tener propiedades prometedoras para la erradicación o control de los microorganismos patógenos, mediante metodología denominada *inactivación fotodinámica* (PDI).

1.2. Terapia fotodinámica

Una de las aplicaciones más recientes y significativas de la fotosensibilización en medicina es la detección y el tratamiento de tejidos neoplásicos [1]. La PDT del cáncer es una

modalidad terapéutica promisorio para el tratamiento y cura de algunos tumores sólidos [10,11]. Básicamente involucra la administración de un fotosensibilizador, el cual es incorporado y acumulado selectivamente en las células tumorales. Luego el tejido neoplásico es expuesto a la luz visible originando de esta manera productos tóxicos, los cuales comienzan una cascada de eventos bioquímicos que inactivan específicamente células neoplásicas (Figura 2) [12,13].

El mecanismo preciso por el cual actúa la PDT no está aún completamente elucidado, pero es ampliamente aceptado que la especie reactiva oxígeno molecular singlete $O_2 (^1\Delta_g)$, o simplemente 1O_2 , es el principal producto tóxico responsable del fotodaño [14,15]. Además, otras especies reactivas del oxígeno (ROS) pueden estar involucradas en los fotoproductos responsables de la toxicidad [13,16]. Los efectos de la PDT podrían implicar un daño directo a la célula tumoral y también una muerte celular indirecta por cambios en la microcirculación, resultante de la disminución del flujo sanguíneo en el tumor [6,17,18].

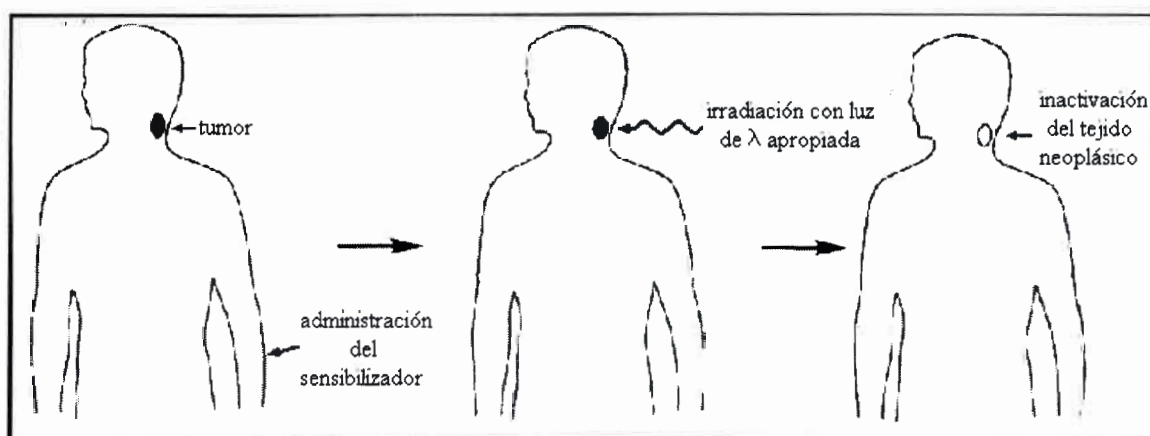


Figura 2. Etapas de la PDT para el tratamiento de tumores.

Las principales ventajas de la PDT sobre otros tratamientos convencionales contra el cáncer son, la baja toxicidad sistémica, ya que los fotosensibilizadores son activados sólo en presencia de luz, la habilidad para destruir selectivamente tumores y su aplicación potencial en conjunto con otras modalidades terapéuticas, tales como quimioterapia, cirugía, radioterapia o inmunoterapia [1,13, 19]. Los tejidos neoplásicos tratables incluyen a aquellos tumores que pueden ser irradiados externamente o internamente por endoscopios a través del uso de fibras ópticas [19,20]. Una limitación de la PDT se encuentra en las propiedades ópticas del tejido, que determinan tanto la penetración como la intensidad de luz que puede

ser tolerada para no producir efectos térmicos [12,21]. Los tejidos humanos transmiten la luz más efectivamente en la región roja del espectro visible, y consecuentemente, la ventana para la penetración óptima es entre 600-800 nm (Figura 3) [12].

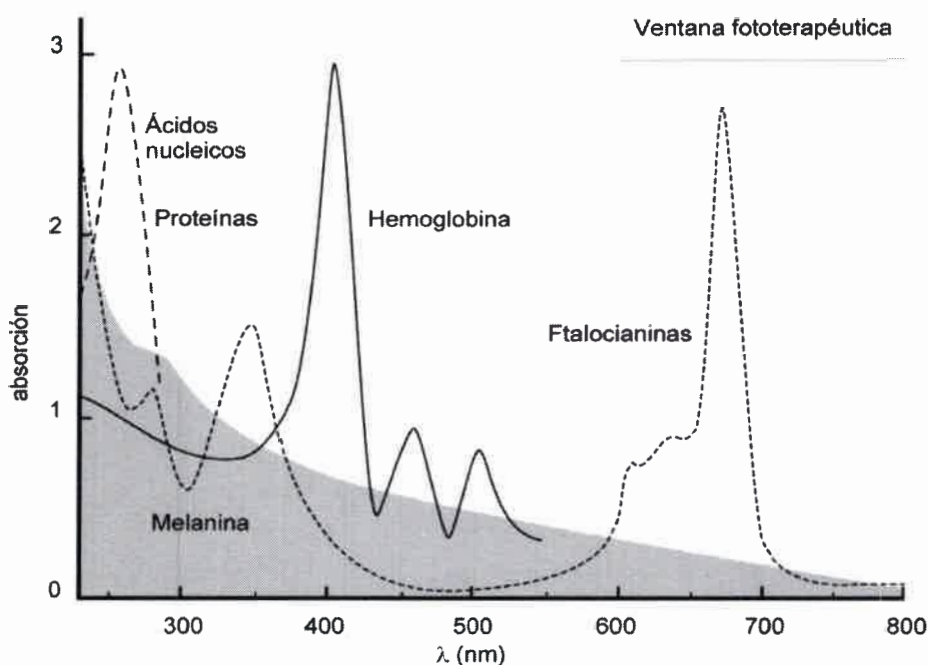


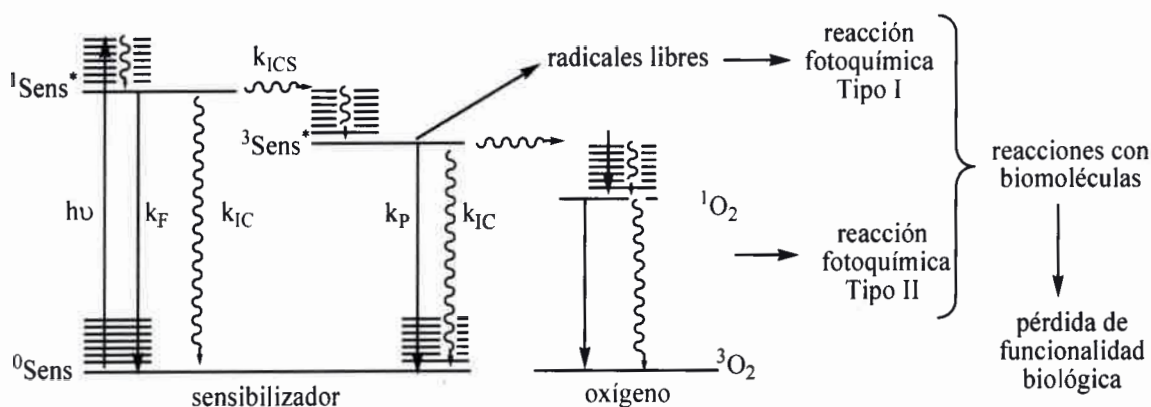
Figura 3. Ventana fototerapéutica para el tratamiento de tejidos.

La PDT ha sido utilizada exitosamente en el tratamiento de varios tumores [6,11,19]. En el presente, otras aplicaciones útiles de la PDT en sistemas biológicos son el uso de fotosensibilizadores como herbicidas [22,23], insecticidas [24,25], antibacterianos, antimicóticos y antivirales [26,27] y para la esterilización de agua, fluidos biológicos y sangre contaminada con microorganismos patógenos [27-29].

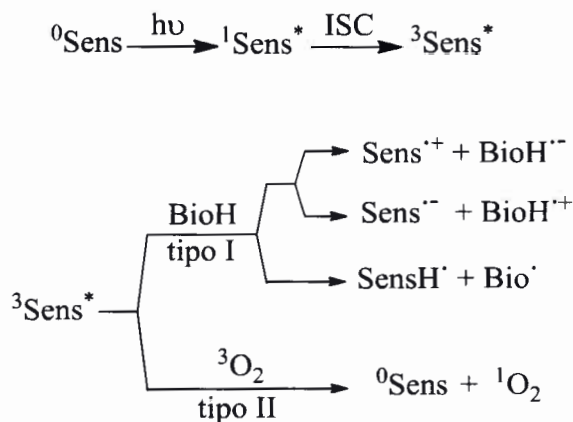
1.3. Procesos de fotosensibilización

Cuando se combinan un fotosensibilizador ($^0\text{Sens}$), luz y oxígeno pueden ocurrir básicamente dos mecanismos, los cuales son considerados los principales implicados en el fotodaño de células [16,30]. En ambas reacciones el sensibilizador en estado basal ($^0\text{Sens}$) es excitado por la absorción de luz a un estado excitado singlete de mayor energía ($^1\text{Sens}^*$),

seguido de un entrecruzamiento de sistema (ICS) a un estado excitado triplete ($^3\text{Sens}^*$). La energía del fotosensibilizador excitado puede ser disipada por procesos radiactivos, como fluorescencia (F) desde $^1\text{Sens}^*$ o fosforescencia (P) desde $^3\text{Sens}^*$ (aunque poco probable en solución) o por un decaimiento térmico (IC) desde cualquiera de los dos estados (Esquema 2). El estado $^3\text{Sens}^*$ puede reaccionar con un sustrato (BioH), tal como una biomolécula, formando radicales libres a través de una transferencia de electrones o protones mediante el mecanismo tipo I. La mayoría de estos radicales reacciona instantáneamente con oxígeno para generar una mezcla compleja de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\text{OH}\cdot$. Estos intermediarios son capaces de oxidar una amplia variedad de biomoléculas [16]. También, los radicales libres pueden recombinarse y no dar reacción. Por otro lado, en las reacciones tipo II la energía de $^3\text{Sens}^*$ es transferida al oxígeno molecular en estado basal ($^3\text{O}_2$) para formar $^1\text{O}_2$ (Esquema 3).



Esquema 2. Procesos fotoquímicos involucrados en la PDT.



Esquema 3. Mecanismos del proceso fotodinámico.

Ambos mecanismos pueden ocurrir simultáneamente, y la relación entre los dos procesos depende principalmente del sensibilizador, el sustrato y la naturaleza del medio [14]. Sin embargo, en general son necesarias condiciones aeróbicas para la inactivación celular efectiva. En presencia de oxígeno, y utilizando macrociclos tetrapirrólicos como fotosensibilizadores, está aceptado que el $^1\text{O}_2$ es la principal especie responsable de la inactivación celular [31-33]. Además, aún si el fotosensibilizador excitado reacciona con un sustrato dado por el fotoproceso tipo I, el resultado final es la oxidación de la biomolécula [34,35]. El tiempo de vida del $^1\text{O}_2$ en el entorno celular está limitado por la desactivación y las reacciones con constituyentes celulares [14]. La distancia de difusión en las células ha sido estimado en $\sim 0,1 \mu\text{m}$ [36,37], y por lo tanto el daño celular mediado por $^1\text{O}_2$ ocurre cerca del lugar de su generación [14].

El $^1\text{O}_2$ y otras ROS rápidamente reaccionan con una variedad de sustratos incluyendo al colesterol [38-40], ácidos grasos insaturados de membrana [41-44], residuos de aminoácidos, tales como cisteína, histidina y triptófano de estructuras proteicas [45-48], como también con bases de ácidos nucleicos, particularmente guanina y timina [38,48-53]. Estas reacciones inducen daños en las biomoléculas, lo que conduce a la pérdida de la función biológica, produciendo la inactivación celular [13].

1.4. Fotosensibilizadores

Los fotosensibilizadores son moléculas capaces de excitarse por la absorción de radiación y transferir la energía a otras moléculas. En cuanto a los aspectos químicos, los requisitos más importantes que deben caracterizar a un fotosensibilizador para lograr una actividad fotodinámica efectiva son [13,15]:

- a) Un proceso de síntesis adecuado.
- b) Pureza química alta.
- c) Coeficiente de absorción alto en la región visible del espectro, principalmente en la ventana fototerapéutica (600 a 800 nm).
- d) Estado excitado triplete con un tiempo de vida largo para producir ROS eficientemente ($\tau_T > 1 \mu\text{s}$) [1,30].
- e) Energía del estado triplete apropiada ($E_T > 95 \text{ kJ/mol}$) para transferir eficientemente la energía al estado fundamental del oxígeno.

f) Fotoestabilidad en las condiciones de tratamiento. Si se descompone muy rápido, el efecto fotodinámico puede ser incompleto. Una velocidad de descomposición apropiada permitiría inactivar las células y luego eliminar el fotosensibilizador del medio disminuyendo el efecto fotocitotóxico remanente.

g) Solubilidad. Las propiedades fotofísicas del fotosensibilizador varían según este se encuentre en forma monomérica o agregada, y por lo tanto esto afectará directamente el daño fotodinámico.

h) Alta habilidad para inducir la muerte tumoral. Un buen fotosensibilizador debe producir una inactivación celular eficiente a bajas concentraciones y aún a bajas dosis de luz irradiada [12].

En general, las características fotofísicas varían no sólo con los sustituyentes de los fotosensibilizadores sintetizados, sino también con la formación de complejos con distintos metales, tales como Zn(II), Cu(II), Ni(II) o Pd(II) [54].

Además, el fotosensibilizador ideal debería cumplir con ciertas características biológicas, tales como:

a) Solubilidad en fluidos biológicos. Si el compuesto es insoluble en el medio, debe poder transportarse al tumor utilizando algún tipo de formulación (liposomas, aceite de castor, emulsiones, ciclodextrinas). Sin embargo, es importante destacar que un elevado carácter hidrofílico en las estructuras puede impedir la interacción con las células. Por lo tanto, es necesario un balance adecuado entre la hidrofiliidad y la lipofiliidad para obtener los mejores resultados de incorporación intracelular.

b) Localización y retención selectiva en el tumor. El mecanismo de acción de los compuestos con actividad terapéutica está influenciado por sus propiedades fisicoquímicas y por las interacciones específicas (puente de hidrógeno, transferencia de carga, interacciones electrón dador-aceptor) y no específicas (causadas por efectos de polaridad-polarizabilidad) en las que puedan participar con el entorno biológico.

c) Mínima toxicidad en ausencia de luz. El fotosensibilizador debe presentar baja citotoxicidad en ausencia de luz.

d) Rápida eliminación del fármaco en los tejidos no tumorales y mínima fotosensibilidad cutánea.

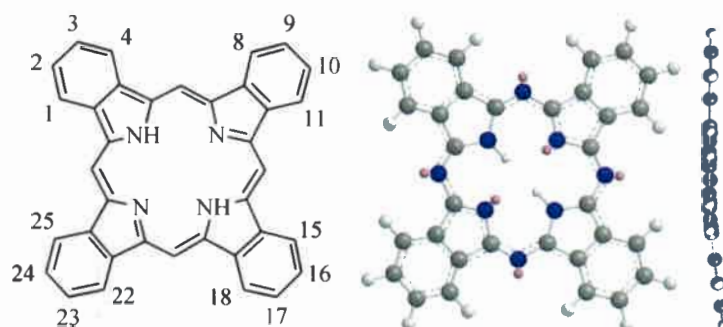
La mayoría de los fotosensibilizadores para PDT, poseen una estructura de anillo heterocíclico similar al de la clorofila o al grupo hemo en la hemoglobina. En los últimos años nuevos sensibilizadores han sido propuestos como agentes fototerapéuticos, mejorando sus propiedades físicas, químicas y terapéuticas para su uso en PDT [20,55-57]. Recientemente,

se ha informado que varias clases de fotosensibilizadores tienen aplicación clínica o se hallan en desarrollo en medios biológicos [20]. Las ftalocianinas y estructuras relacionadas, han sido estudiadas ampliamente como posibles fármacos alternativos aplicables en la PDT [35].

1.5. Ftalocianinas

1.5.1. Características generales de las ftalocianinas

Las ftalocianinas (Pcs) son tetrabenzotetraazaporfirinas, su mitad pirrólica está unida por nitrógenos aza a anillos bencénicos fusionados en los pirroles (Esquema 4).

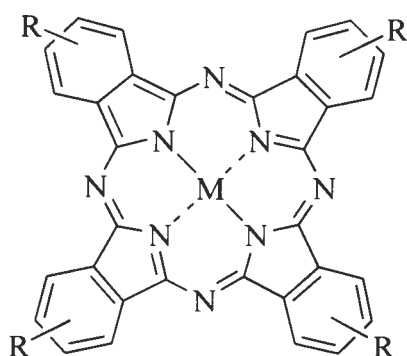


Esquema 4. Representación e imágenes en tres dimensiones de ftalocianinas.

El macrociclo de la ftalocianina puede formar quelatos con varios metales (MPcs), tales como Zn(II), Cu(II) y Si(IV), y sus anillos bencénicos pueden ser sustituidos por distintos grupos (Esquema 5).

Los primeros derivados de ftalocianinas fueron sintetizados en 1907 de manera casual durante un estudio de las propiedades de 1,2-cianobenzamida [58]. Desde entonces, se han sintetizado una amplia gama de ftalocianinas metálicas. En particular CuPc, se produce a gran escala. Los macrociclos metálicos han sido utilizados en la industria como colorantes debido a que por la deslocalización de sus 18 electrones se caracterizan por un intenso color azul-verde. En los últimos años, las aplicaciones de los complejos metálicos se han expandido a áreas tales como fotosensibilizadores en PDT, agentes fotoconductores y electrocatalizadores [59].

Las ftalocianinas muestran una estabilidad térmica y una química excepcional. En particular, los complejos de ZnPc son conocidos por su capacidad fotosensibilizante, mientras que los complejos de ftalocinina no metalados muestran poca eficiencia en PDT [59].

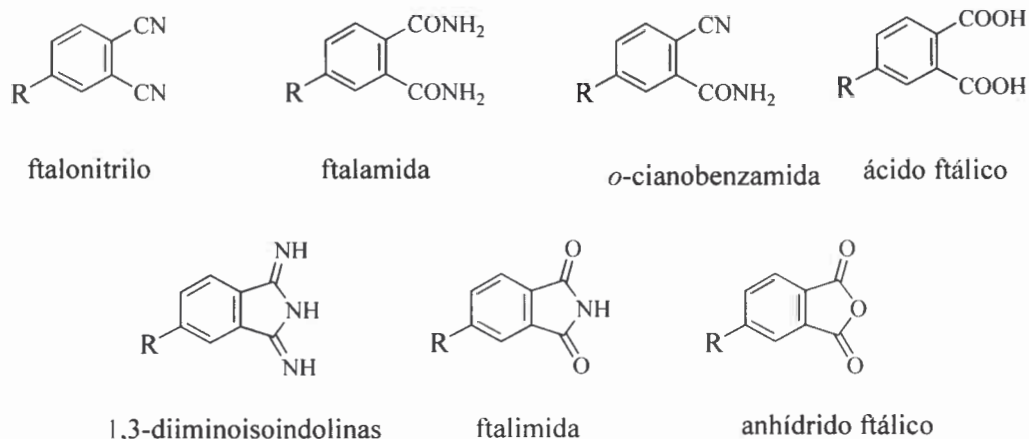


Esquema 5. Ftalocianina metálica sustituida (M= Cu, Co, Zn, Ni, entre otros)

1.5.2. Síntesis de Ftalocianinas

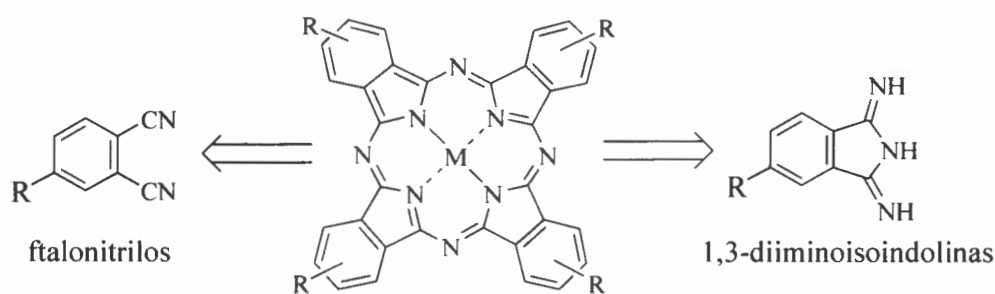
La síntesis de ftalocianinas ha sido intensamente estudiada desde comienzo de los 30' [60,61]. Más de 70 años después de su descubrimiento, no se ha perdido el interés en seguir investigando nuevas rutas de obtención. Estos compuestos pueden ser obtenidos partiendo de diversos materiales precursores, tales como ftalonitrilo, 1,3-diiminoisindolina, *o*-cianobenzamida, ftalimida, ácido ftálico y anhídrido ftálico (Esquema 6).

Los complejos pueden ser obtenidos desde los metales o sus sales tanto químicamente como electroquímicamente. En las reacciones químicas se emplean los metales elementales o sus sales, los precursores anteriormente mencionados y disolventes no acuosos de alto punto de ebullición tales como nitobenceno, diclorobenceno, triclorobenceno, entre otros. Algunos alcoholes han sido acertadamente seleccionados como solventes cuando se utilizan ftalonitrilos como agentes precursores de las ftalocianinas. Los metales mayormente empleados son metales de transición tales como Fe, Co, Ni y Cu, también Zn y Cd. En los ftalocianinatos formados con metales de la primera serie del bloque f (lantánidos) el ion se encuentra fuera del plano del macrociclo. La factibilidad de la electrosíntesis de ftalocianinas fue reportada por primera vez en 1980 [62]. Sin embargo la ruta electroquímica al igual que otras metodologías, tales como la irradiación con microondas o el tratamiento ultrasónico, no son frecuentemente utilizadas en la preparación de derivados de ftalocianinas [63].



Esquema 6. Principales precursores de ftalocianinas

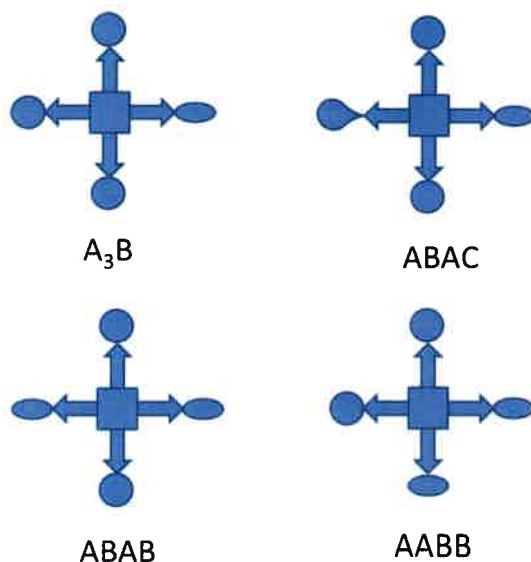
Los ftalonitrilos y las 1,3-diiminoisoindolinas son los precursores más empleados en la síntesis de ftalocianinas (Esquema 7). En particular, los ftalonitrilos son de gran importancia ya que producen complejos con la mayoría de los metales. La síntesis de ftalocianina partiendo de estos precursores posee buenos rendimientos. Generalmente, la reacción se lleva a cabo por calentamiento del ftalonitrilo en presencia del ion metálico en un solvente de alto punto de ebullición en un proceso catalizado por bases [64,65].



Esquema 7. Retrosíntesis de ftalocianinas.

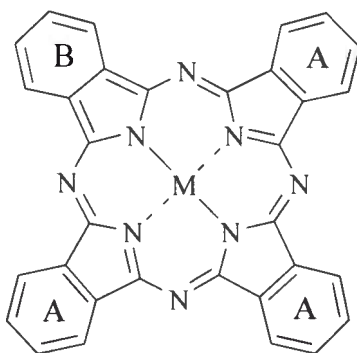
Los derivados de ftalocianinas son obtenidos exclusivamente mediante la síntesis en el laboratorio. Estos compuestos corresponden a las porfirazinas más estudiadas y mejor conocidas. En la última década la atención se ha centrado en los métodos de preparación de

los complejos asimétricos. Existen cuatro tipos de ftalocianinas asimétricas: A_3B , ABAC, ABAB y AABB (Esquema 8) [66].



Esquema 8. Ftalocianinas asimétricas

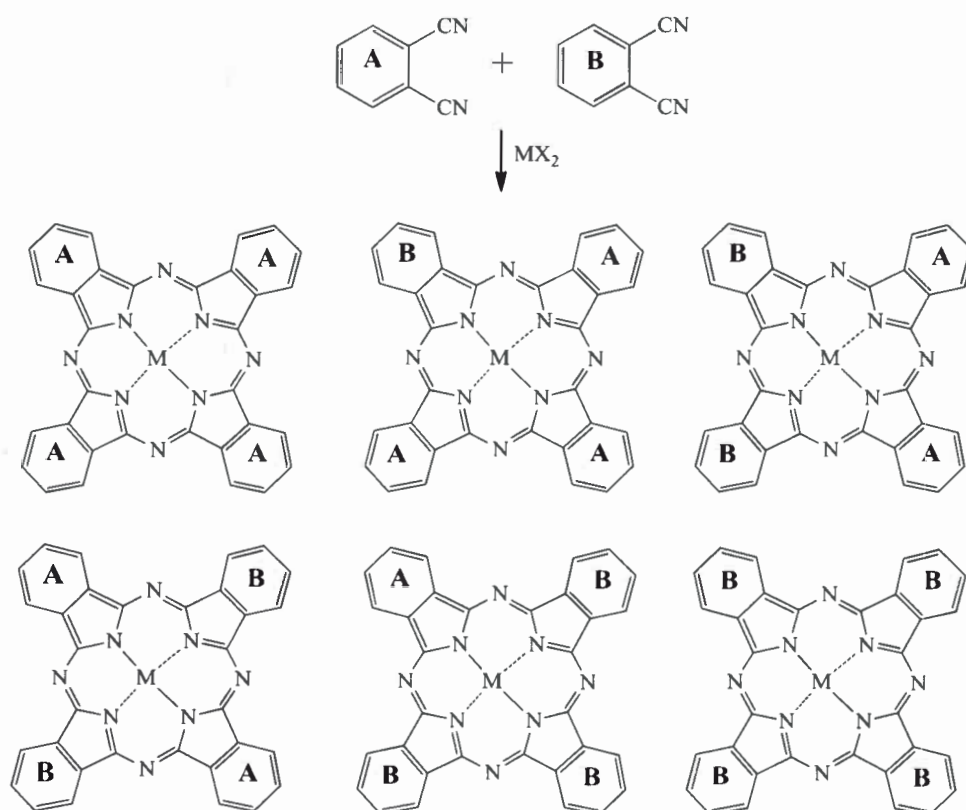
Además de las cargas positivas intrínsecas en una molécula, la combinación de sustituyentes hidrófobos e hidrófilos también puede facilitar la penetración de la membrana celular y aumentar la acumulación en los compartimentos subcelulares, ya que le brindan al sensibilizador un eje de polaridad intramolecular que aumenta la eficiencia de la fotosensibilización. El diseño de la arquitectura del sensibilizador anfifílico requiere la formación de ftalocianinas con simetría A_3B que comprenden tres subunidades isoindol idénticas (A) y una diferente (B) (Esquema 9).



Esquema 9. Ftalocianina con simetría A_3B .

El estudio de la metodología de síntesis de ftalocianinas A_3B ha sido de gran interés en los últimos años [67]. Distintas estrategias, como la condensación estadística y la expansión de subftalocianinas, han sido empleadas en la preparación de estos derivados asimétricos.

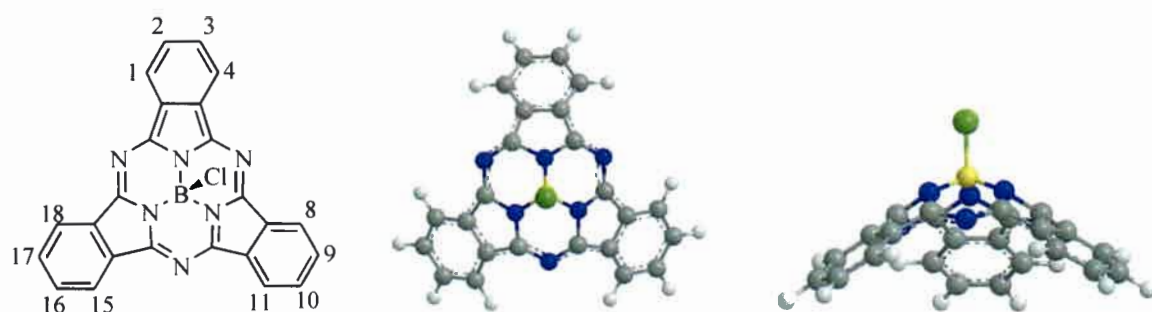
La condensación estadística es la ruta de síntesis mayormente usada para preparar ftalocianinas A_3B . Este método no selectivo está basado en la reacción entre dos ftalonitrilos sustituidos con diferentes grupos (A y B) en presencia de una sal del metal central deseado (MX_2). Como producto de síntesis se obtiene una mezcla de seis compuestos: A_4 , A_3B , A_2B_2 , $ABAB$, AB_3 , B_4 (Esquema 10). La condensación estadística requiere del uso de técnicas cromatográficas para separar las ftalocianinas deseadas de la mezcla de productos. La separación de los derivados es compleja y en general requiere de cromatografía en columna. Los rendimientos que se pueden lograr son relativamente bajos, varían entre el 5 y 10 %, dependiendo de los grupos que sustituyen al macrociclo. Además, no siempre es posible separar la ftalocianina de interés de la mezcla de productos. Este método tradicional ha sido utilizado ampliamente en la síntesis de diversos derivados de ftalocianinas [65,68,69].



Esquema 10. Síntesis de A_3B por condensación estadística.

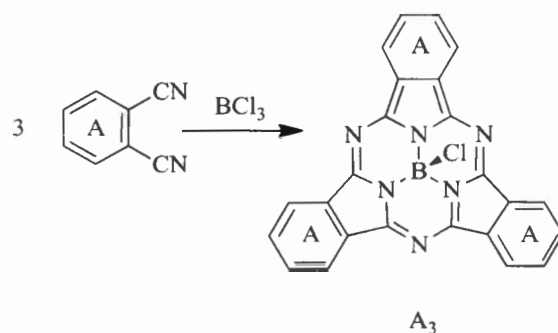
La expansión de una subftalocianina es una metodología alternativa a la condensación estadística para la obtención de ftalocianinas con simetría A_3B [70-72]. Esta estrategia, desarrollada en la década de los 80 por Kobayashi [70], fue la primera ruta de obtención selectiva de estos derivados.

Las subftalocianinas (SubPc) contienen boro como metal central y presentan una deslocalización aromática con 14 electrones π . Estos macrociclos están compuestos de 3 anillos diiminoisoindol fusionados alrededor de un átomo de boro (Esquema 11). Estas estructuras no son planas, y en contraste con las ftalocianinas no se agregan en una amplia variedad de solventes [72-75].



Esquema 11. Representación e imágenes en tres dimensiones de subftalocianina.

Las subftalocianinas pueden ser sintetizadas por reacción de un ftalonitrilo en presencia de BCl_3 (Esquema 12).

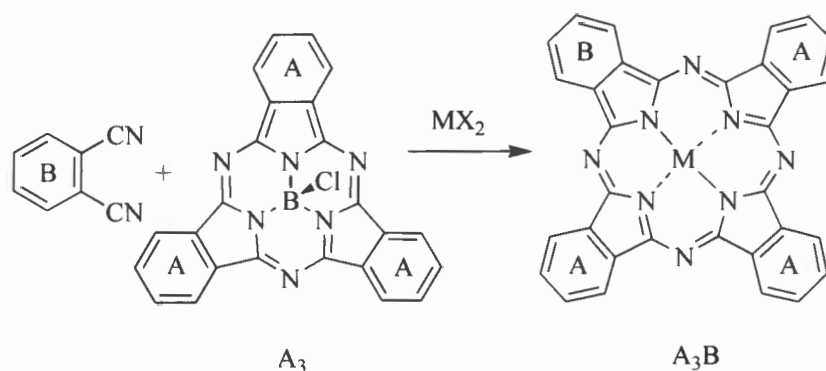


Esquema 12. Síntesis de una subftalocianina.



La apertura del anillo de subftalocinina (SubPc) con simetría A_3 se logra por tratamiento con un ftalonitrilo sustituido (B) en presencia de MX_2 , de esta manera se obtiene la ftalocianina A_3B (Esquema 13). Esta reacción es altamente dependiente de los reactivos y de las condiciones experimentales, pudiendo obtenerse rendimientos relativamente altos.

Este método ha sido utilizado ampliamente en la síntesis de diversos derivados de ftalocianinas [76,77].



Esquema 13. Síntesis de ftalocianinas A_3B por expansión de una subftalocianina.

1.5.3. Características espectroscópicas y fotoquímicas

A diferencia de los complejos no metalados, las zinc(II) ftalocianinas muestran una particular habilidad fotosensibilizadora [78,79].

El rendimiento cuántico de producción de 1O_2 (Φ_Δ) de los complejos MPcs puede determinarse convenientemente usando la fototoxidación de sustratos como 9,10-dimetilantraceno (DMA) o 1,3-difenil-iso-benzofurano (DPBF), o mediante el método de luminiscencia de oxígeno singlete. Los dos métodos dan resultados comparables [80].

El espectro de absorción de las ftalocianinas está caracterizado por dos regiones, una banda en la zona de los 350 nm (banda Soret) y otra banda muy intensa (banda Q, $\epsilon > 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en la región de la ventana fototerapéutica (Figura 4). Los espectros de la zinc(II) ftalocianinas muestran el patrón característico de los complejos con metales, con una banda Q(0,0) intensa, desde el modo vibracional 0 del fundamental al vibracional 0 del primer estado electrónico excitado y los satélites vibracionales Q(1,0) y Q(2,0) desde los estados vibracionales 1 y 2 del fundamental, respectivamente.

La fotoestabilidad de los complejos metalados es importante para sus aplicaciones como fotosensibilizadores. Cuando la MPc es expuesta a la luz, puede ocurrir la fotodegradación de la misma que se observa mediante una disminución en la intensidad de los espectros (tanto en la región de la banda Q y como en la banda B) sin desplazamiento en los máximos o formación de nuevas bandas.

Por último, los parámetros que caracterizan la fluorescencia de los complejos se pueden determinar por los métodos comparativos, usando referencias bien conocidas [81,82].

Además, los macrociclos de las ftalocianinas presentan valores elevados de rendimiento cuántico de fluorescencia Φ_F ($\sim 0,2$) [1,65,83].

La importancia de las ftalocianinas en PDT deriva de su alta producción de 1O_2 . Estos complejos son estables, de baja toxicidad y tienden a localizarse en tejidos tumorales [84]. Por lo tanto, estos fotosensibilizadores tienen propiedades fotofísicas interesantes para ser usados en PDT y son considerados unos de los fotosensibilizadores más efectivos [85,86].

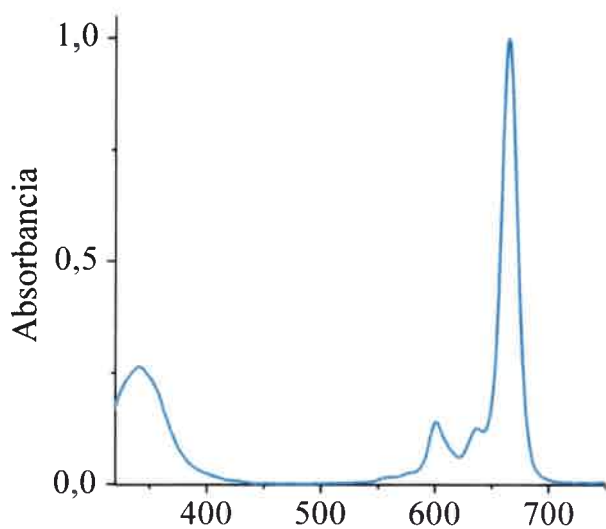


Figura 4. Espectro de absorción de zinc(II) ftalocianina (ZnPc) en tetrahidrofurano.

La relación hidrofobicidad/hidrofilicidad es importante cuando se considera la incorporación y la localización intracelular en los microorganismos. La escasa solubilidad de las ftalocianinas es la principal dificultad de esta familia de compuestos [1]. El macrociclo de las ftalocianinas es esencialmente hidrofóbico por lo que el anillo sin sustituir es poco

efectivo [87]. Por lo tanto, es conveniente variar las propiedades anfífilas de las ftalocianinas mediante la incorporación de grupos sustituyentes.

1.5.4. Formación de agregados

Uno de los principales problemas encontrados en la utilización de ftalocianinas es la formación de agregados en solución. En este contexto, la agregación involucra asociación entre moléculas de soluto a partir de unidades individuales (monómeros). Dichos agregados pueden ser dímeros, trímeros, oligómeros o bien una mezcla de ellos. El fenómeno se origina cuando las interacciones entre moléculas de soluto son energéticamente más favorables que las interacciones entre moléculas de soluto y solvente. En general, hay dos tipos de agregación i) la que involucra una interacción entre dos o más solutos diferentes (hetero-agregación) y ii) la que proviene de un único tipo de soluto (auto-agregación). Las moléculas pueden formar agregados cuando existen fuerzas intermoleculares no específicas, tales como van der Waals y dispersivas, como así también específicas como puente hidrógeno, interacciones π - π y aquellas que involucran especies dador-aceptor de electrones. En ftalocianinas con estructuras simples, las interacciones más importantes son las del tipo $\pi \rightarrow \pi$. En la Figura 5 se muestran las posibles geometrías involucradas en la formación de agregados de ftalocianinas.

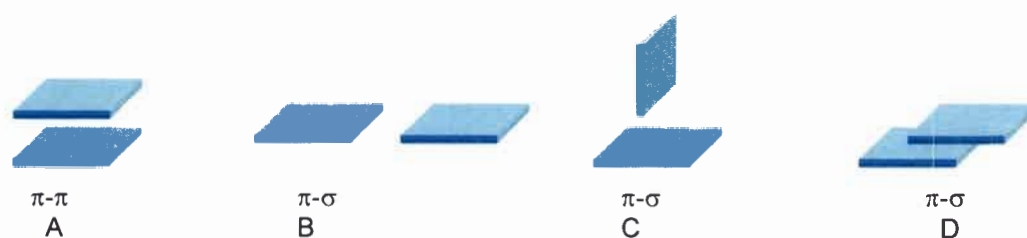


Figura 5. Posibles geometrías de agregados de ftalocianinas.

La formación de agregados en las ftalocianinas es un proceso reversible y el equilibrio es desplazado hacia los agregados por diferentes factores físicos como: a) disminución de la temperatura, b) incremento de la concentración, c) incremento de la polaridad del solvente y d) disminución del impedimento estérico [1].

Distintos estudios con ftalocianinas mostraron que cuando éstas forman agregados pueden observarse: i) variaciones en los espectros de absorción y emisión de fluorescencia; ii) disminución de los rendimientos cuánticos de fluorescencia; iii) disminución en los valores de rendimientos cuánticos de producción de $^1\text{O}_2$ y iv) disminución de la efectividad como sensibilizador en tratamientos de PDT [88,89].

Los agregados pueden ser detectados por medio de: i) la desviación de la ley de Lambert-Bert; ii) el aumento del ancho en los picos de absorción y la disminución en el coeficiente de absorción molar (ϵ) con el aumento de la concentración. Este tipo de comportamiento es característico de los agregados del tipo H y J los cuales están acompañados por la aparición de una nueva banda de absorción, en las proximidades de la banda Q [90]. La aparición de una banda cercana a los 750 nm es asignada a la formación de agregados del tipo J, mientras que una banda corrida hacia el azul, cercana a los 630 nm, es asignada a la formación de agregados tipo H [59]. En los dímeros tipo J los dipolos están en línea, mientras que en los agregados tipo H los dipolos de los macrociclos se encuentran paralelos.

1.6. Inactivación fotodinámica de microorganismos

1.6.1. Control de enfermedades infecciosas

La introducción de las drogas antibacteriales en la medicina, comenzó en 1930, y sumado al uso de vacunas, llevaron a creer que las enfermedades infecciosas podrían ser controladas y eventualmente erradicadas. Aunque los antibióticos han salvado incontables vidas y transformado la práctica de la medicina, el optimismo inicial fue por demás prematuro y las enfermedades infecciosas continúan liderando las causas de muerte a nivel mundial [91,92]. El incremento de la resistencia a los antibióticos entre las bacterias patogénicas podría ponerle fin a un periodo que abarca los últimos 50 años, conocido como la “Era de los antibióticos” [93].

Muchos factores han afectado la habilidad de controlar las enfermedades infecciosas adquiridas en hospitales y en la población general. El continuo cambio en el espectro de los agentes patógenos que causan infecciones en los seres humanos y los factores ambientales, sociales, políticos y económicos han impactado en la propagación de estas enfermedades. Agentes, como el HIV, que afectan al sistema inmune, han permitido la aparición de nuevas

infecciones. Por otro lado, las nuevas técnicas de diagnóstico han demostrado que distintas enfermedades presentes durante décadas, son producidas por microorganismos. Por ejemplo, ahora se sabe que *Helicobacter pylori*, tiene un rol importante en enfermedades gástricas [92,94]. A pesar que el avance en la cirugía ha permitido extender la sobrevivencia de miles de personas, los pacientes pueden quedar expuestos a patógenos oportunistas. Lo mismo ocurre con aquellos que son inmunocomprometidos, que están expuestos a ser atacados por numerosos agentes y deben ser tratados con antibióticos durante periodos de tiempo prolongados. El avance en técnicas como transfusiones y transplantes de órganos, donde los pacientes deben ser inmunodeprimidos, también los dejan expuestos a infecciones, en especial las de tipo intrahospitalarias [95]. No debemos olvidar además, el deterioro de las condiciones sociales en los países en desarrollo y en las potencias industrializadas que han contribuido al resurgimiento de algunas enfermedades como la tuberculosis.

La prescripción inapropiada de antibióticos, el mal uso de los mismos por parte de algunos pacientes, su utilización extendida en la alimentación del ganado, entre otras razones, han favorecido la resistencia de los microorganismos (Figura 6) [92].

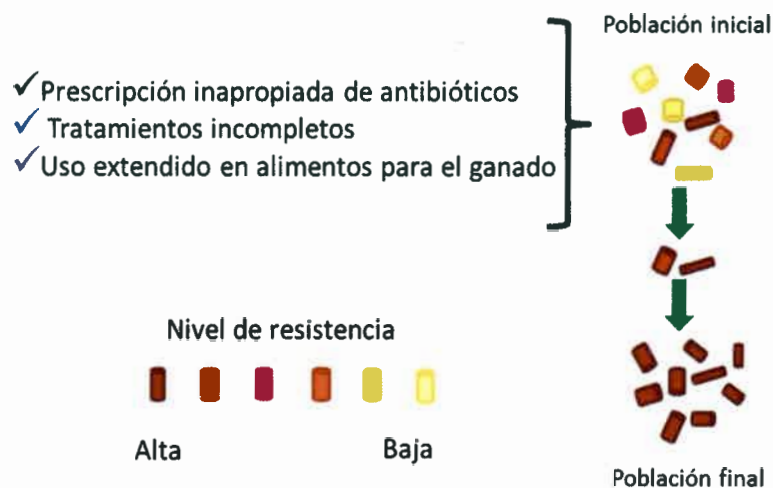


Figura 6. Resistencia de los microorganismos a los antibióticos

Actualmente se pueden encontrar cepas que son resistentes a múltiples drogas y las infecciones que generan se tornan difíciles de tratar. Estas cepas multirresistentes tienen fuerte presencia en los hospitales, un medio donde se hace uso de varios tipos de antibióticos, favoreciendo su selección.

El tratamiento de los patógenos multirresistentes involucra antibióticos más fuertes o en concentraciones tan elevadas que comprometen la salud del paciente. Una alternativa sería el uso conjunto de diferentes antibióticos con el fin de reducir las posibilidades de desarrollar algún tipo de resistencia. Sin embargo muchos de los antibióticos disponibles están químicamente relacionados, y los patógenos están desarrollando mecanismo de defensas contra ellos [96].

1.6.2. Efecto fotodinámico en los microorganismos

El termino “microorganismo” engloba al conjunto de organismos microscópicos que existen como células aisladas, o agrupaciones celulares, y a los virus. La estructura básica de una célula, consiste en una bicapa lipídica, la cual encierra el citoplasma, una solución acuosa de proteínas, enzimas, sales y nutrientes, donde ocurren los procesos físicos y químicos que permiten la vida.

Los microorganismos se pueden clasificar como *Procariotas* y *Eucariotas* dependiendo de la forma en que resguardan la información genética codificada en el ácido desoxiribonucleico (ADN). En los microorganismos *Procariotas*, entre los cuales se encuentran las bacterias, el ADN se localiza en el citoplasma en una región llamada nucleoide. En los microorganismos *Eucariotas*, entre los cuales se encuentran los hongos, el ADN se halla resguardado en el núcleo celular.

En los últimos años, el patrón cambiante de enfermedades infecciosas y la resistencia emergente a antibióticos de uso corriente han hecho necesario encontrar nuevas alternativas para el tratamiento de infecciones microbianas. La inactivación fotodinámica de microorganismos (PDI) surge como una alternativa probable debido a que no se han reportado resistencia ni efectos mutagénicos [97,98]. Los objetivos más relevantes de esta aplicación medicinal, son lograr una alta selectividad del fotosensibilizador por los microbios, no causar daño al organismo hospedador, y una alta efectividad, para evitar el resurgimiento de la infección por parte de unos pocos microorganismos sobrevivientes [99].

De manera similar a la PDT, la PDI de microorganismos se basa en la administración de un fotosensibilizador, el cual es acumulado preferencialmente en la célula microbiana. La irradiación subsiguiente con luz visible, en presencia de oxígeno, produce específicamente daños en la célula que, consecuentemente, inactiva a los microorganismos (Figura 7) [100].

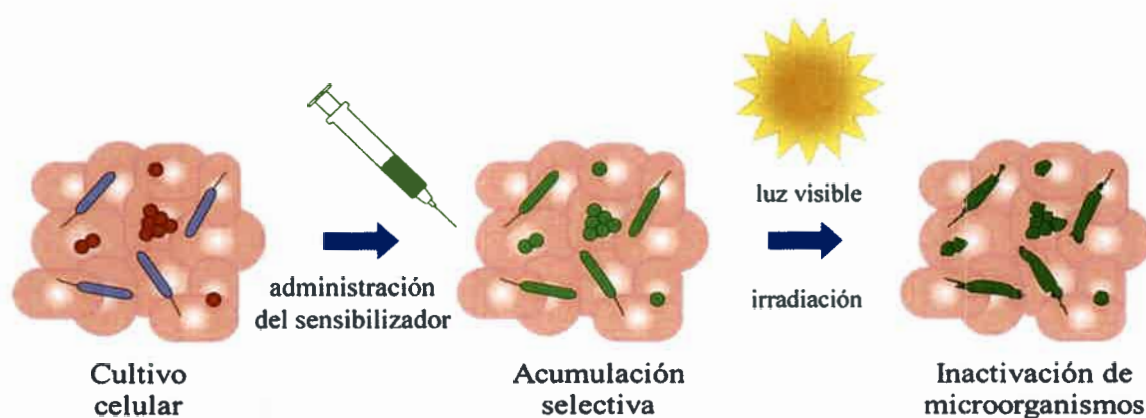


Figura 7. Inactivación fotodinámica de microorganismos

Los beneficios que podría aportar esta metodología pueden resumirse en los siguientes aspectos: primero, la selectividad del agente por el microorganismo, el cual se inactiva mediante una combinación de sensibilizador y dosis de luz mucho más bajas que las necesarias para un efecto similar en células eucariotas. Además, esta irradiación se realiza puntualmente sobre el área afectada, obteniéndose de esta forma una selectividad dual. Segundo, la ausencia de efectos genotóxicos y mutagénicos permite tratamientos seguros por tiempos prolongados, evitando la selección de cepas resistente [99].

En la PDI el fotosensibilizador podría aplicarse directamente sobre la zona afectada en forma tópica, por goteo in situ, inyección intersticial o en aerosol. En esto se diferencia de la PDT, donde el sensibilizador debe ser inyectado por vía intravenosa o en el tumor mismo.

En general, los estudios *in vitro* con microorganismos indican que las bacterias Gram positivas son susceptibles al efecto producido por una variedad de fotosensibilizadores, mientras que las Gram negativas son resistentes a la acción de agentes neutros y aniónicos. Esta resistencia fue asignada a la presencia de una membrana externa organizada, la cual impide la interacción del sensibilizador con la membrana citoplasmática e intercepta las especies reactivas [101-103]. La capa externa está formada por lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas y proteínas con función purina. Las moléculas de LPS proveen una superficie externa polianiónica que está neutralizada parcialmente por los cationes divalentes Mg^{+2} y Ca^{+2} . Por otra parte, la permeabilidad de la pared de los hongos es intermedia entre la de las bacterias Gram positivas y las Gram negativas (Figura 8). En consecuencia, la envoltura celular actúa como una barrera de permeabilidad muy efectiva, relativamente impermeable a drogas neutras y aniónicas [104]. La fotosensibilización de bacterias Gram negativas puede

aumentarse utilizando fotosensibilizadores con cargas positivas intrínsecas. Estos agentes catiónicos interactúan fuertemente con los sitios cargados negativamente de la superficie externa de las bacterias Gram negativas incrementando la eficiencia de los procesos fotodinámicos (Figura 8) [28].

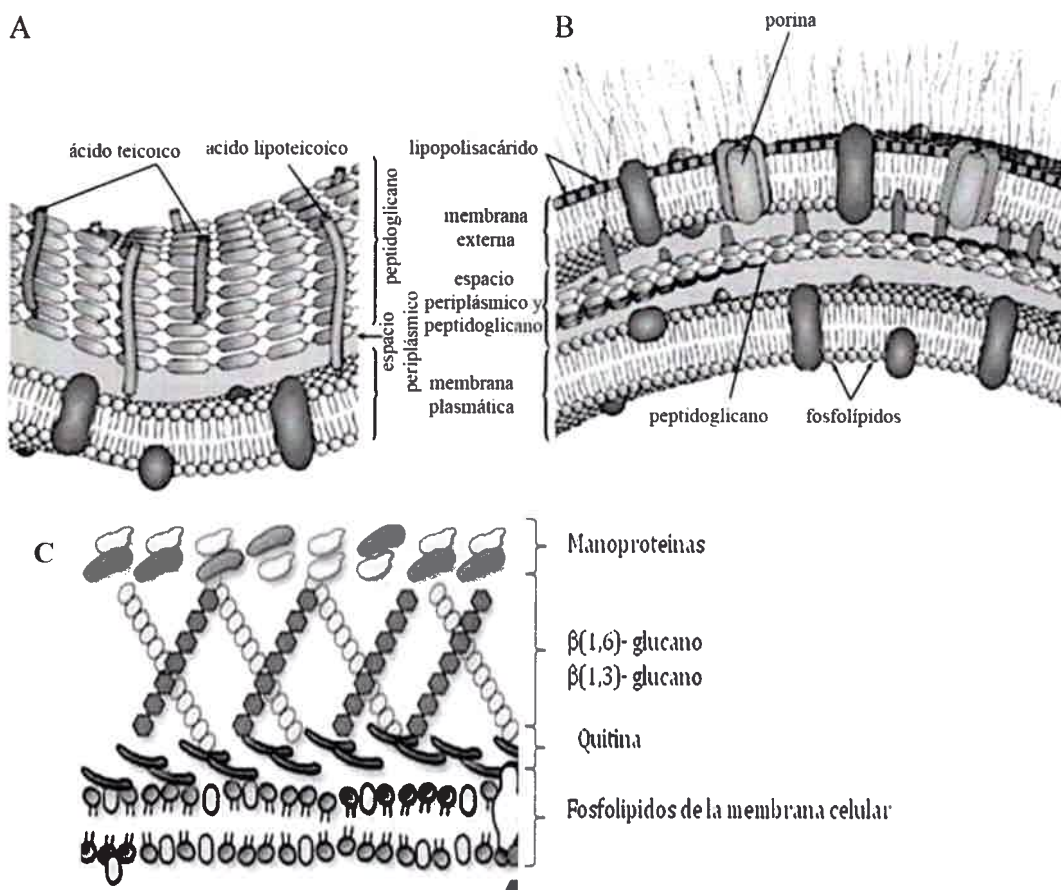


Figura 8. Estructura de la envoltura celular de: A) bacteria Gram positiva, B) bacteria Gram negativa y C) levadura.

En particular, el interés de la PDI de levaduras se basó inicialmente sobre el rol de las mismas como organismos modelos, ya que son fáciles de cultivar y pueden ser usadas para investigaciones que son más complejas cuando se usan cultivos celulares.

Recientemente, la resistencia creciente contra agentes antifúngicos ha renovado el interés en la PDI frente a hongos patógenos o potencialmente patógenos, como lo son *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton rubrum* y especialmente *C. albicans* [105].

1.7. Inactivación fotodinámica de *Candida albicans*

1.7.1. Hongos

Los hongos son organismos eucariotas típicos sin diferenciación tisular. Se distinguen de las células de las plantas en la composición de la pared celular, además, carecen de cloroplastos y clorofila. Por otro lado, a diferencia de células humanas poseen pared celular y presencia de ergosterol en la membrana citoplásmica. Las células fúngicas poseen un núcleo que contiene varios cromosomas. El citoplasma se encuentra limitado por la membrana citoplásmica, la cual es una doble capa de lípidos que contiene proteínas y esteroides. Las paredes celulares constan del 80-90% de carbohidratos, siendo las proteínas, lípidos, polifosfatos e iones inorgánicos el material cementante. La quitina es un constituyente común en los hongos; otros polisacáridos como los mananos, galactanos y quitosanos reemplazan a la quitina en algunos grupos [106].

Los hábitats de los hongos son bastante diversos. La mayoría son de ambiente terrestre o acuático. Un número elevado de hongos son parásitos para plantas, animales, incluidos los humanos. Los hongos constituyen un conjunto grande y diverso, dentro del cual existen tres grupos importantes: hongos filamentosos, levaduras y setas.

1.7.2. Levaduras

Las levaduras son organismos generalmente unicelulares que se reproducen asexualmente por fisión binaria o por gemación. Las células de estos microorganismos son considerablemente de mayor tamaño que las células bacterianas y pueden distinguirse no solo por su tamaño, sino por la presencia de elementos intracelulares tales como el núcleo. Las levaduras están rodeadas por una pared celular rígida compuesta principalmente por polisacáridos solubles e insolubles, como la quitina, β -glucanos y manoproteínas (Figura 9). Se ha informado previamente que los agentes catiónicos interactúan fuertemente con la superficie externa de las levaduras incrementando la eficiencia de los procesos fotodinámicos [55].

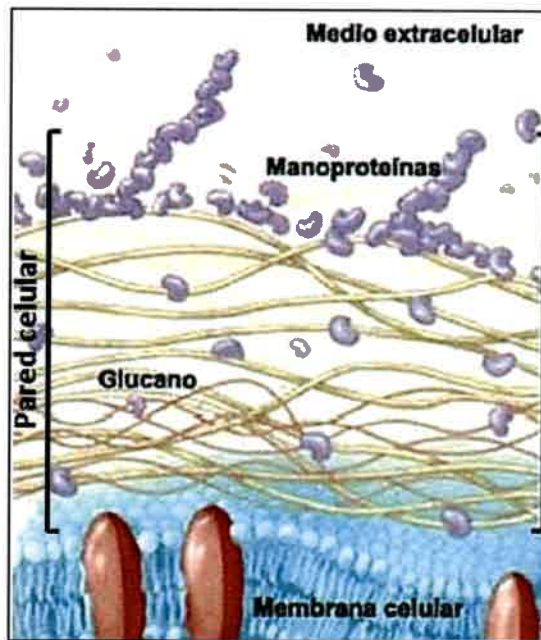


Figura 9. Estructura de la envoltura celular de la levadura

1.7.3. *Candida albicans*

Candida albicans, la más frecuente y virulenta entre otras especies, se encuentra actualmente clasificada taxonómicamente de la siguiente forma: Reino: Hongo; División: Deuteromycota; Clase: Blastomycetes; Familia: Cryptococcaceae; Género: *Candida*; Especies: *albicans* (como la más frecuente y virulenta entre otras) [107]. Esta especie se encuentra dentro de las doce especies pertenecientes al género *Candida* que poseen la facultad de adaptarse a una temperatura de 37 °C y pueden ser ocasionalmente patógenas para el hombre [108].

Esta levadura suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y pseudohifas, que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí [109]. La pared celular está compuesta principalmente por los polisacáridos manano, glucano y quitina. La síntesis de los componentes de la pared celular está dinámicamente influenciada por las condiciones de crecimiento y por los estadios metabólicos. El polisacárido manano representa aproximadamente entre 15,2 y 22,9% del peso seco y poco más de 40% de los polisacáridos de la pared celular de la levadura. El D-glucano β -1,3 y el D-glucano β -1,6 constituyen entre

47% y 60% del peso seco de la pared celular. Otros componentes han sido informados, tales como proteínas en cantidades que oscilan entre 6% y 25%, lípidos entre 1% y 7% y quitina entre 0,6% y 9% del peso de la pared celular [110].

C. albicans es polivalente, es decir, es capaz de generar micosis superficial (en uñas, mucosa oral), micosis profunda localizada (absceso, artritis, nefritis) o micosis sistémica (septicemia) [111].

Las especies de *Candida* crecen bien en medios de cultivo con agar, peptona, dextrosa, maltosa o sacarosa. Para aislarlas de las muestras clínicas que habitualmente contienen bacterias, se agregan al medio simple agentes antimicrobianos como el cloranfenicol [112]. El agar sabouraud glucosado, medio con alto contenido de glucosa, cloranfenicol y pH ácido favorece el crecimiento de hongos por sobre el de bacterias. Las colonias que crecen son lisas, suaves, húmedas y de color y aspecto cremoso. Estas colonias tienen un tamaño que oscila entre 1,5 y 2 mm de diámetro, con aspecto de levadura, de consistencia blanda. Después de 4-5 días se percibe un olor característico (Figura 10).

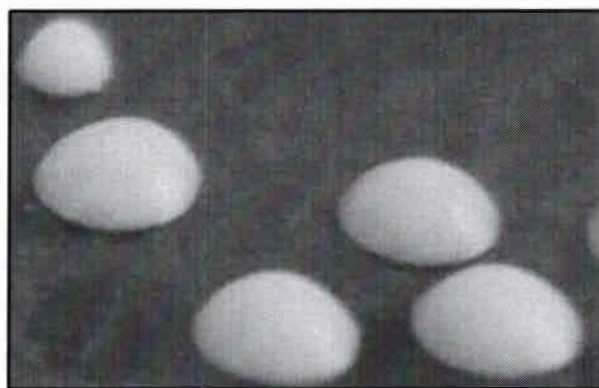


Figura 10. Colonias de *C. albicans* en agar sabouraud.

1.7.4. Candidiasis

La candidiasis es la infección oral fúngica más común en humanos y se manifiesta en distintas formas clínicas que van desde pseudomembranosas, eritematosa y hiperplásica, variantes que recientemente describen un eritema gingival lineal asociado con la infección de HIV [113]. Todas las formas de candidiasis oral son consideradas oportunistas, y una multiplicidad de factores predisponen y facilitan la conversión del comensal *Candida* en una

existencia parasitaria. El incremento de pacientes inmunocomprometidos, los trastornos endócrinos comunes como la diabetes mellitus, y las deficiencias nutricionales han contribuido al resurgimiento de la candidiasis oral como una afección relativamente común.

El uso generalizado de agentes antifúngicos tópicos y sistemáticos en el tratamiento convencional para la candidiasis oral, ha dado lugar al desarrollo de resistencias en *C. albicans*. Estas resistencias parecen aumentar proporcionalmente con la ampliación de la exposición previa a los fármacos antifúngicos [114].

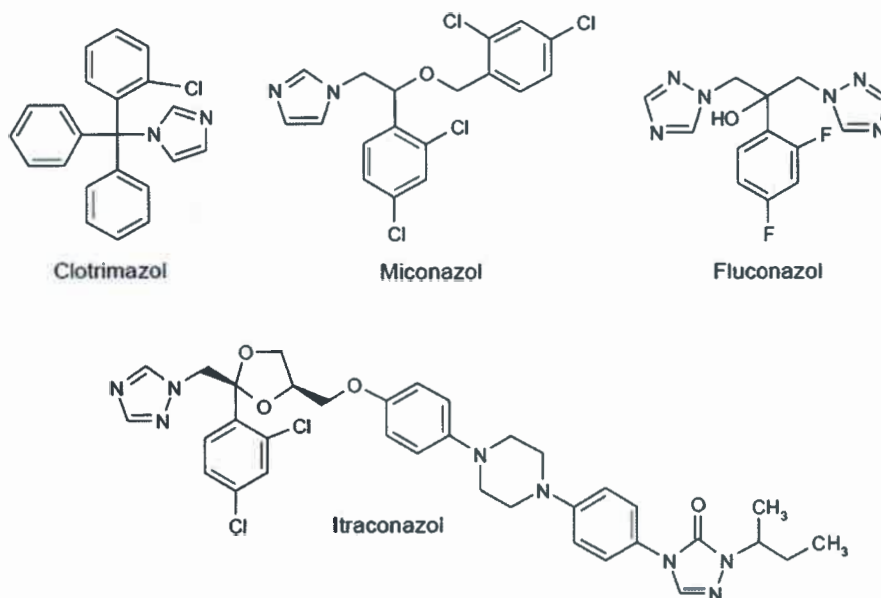
1.7.5. Agentes antifúngicos

La mayor parte de la maquinaria celular de los hongos es la misma que la del hombre y los animales, por lo que los agentes quimioterapéuticos que afectan rutas metabólicas en hongos a menudo interfieren con las correspondientes rutas en las células hospedadoras y por lo tanto estos medicamentos resultan tóxicos. Por esta razón, muchos antifúngicos sólo pueden ser administrados en forma tópica. Sólo unos pocos antifúngicos son de uso clínico y las terapias se ven limitadas por consideraciones de seguridad de los medicamentos.

El tratamiento antifúngico en las dos últimas décadas se ha basado en la utilización de la amfotericina B. Su administración produce efectos adversos importantes y aún así, ha sido el pilar para el tratamiento de infecciones graves dado a su espectro de acción y su eficacia.

Los primeros azoles fueron el clotrimazol y el miconazol, ambos conteniendo un anillo imidazólico en el que recae la actividad del fármaco pero difieren en la distancia entre el imidazol y el átomo de carbono asimétrico (Esquema 14). En la década de los 90 aparecieron el fluconazol y el itraconazol, que si bien revolucionaron el tratamiento de las micosis presentan algunas desventajas que permanecen sin resolver [115].

Los azoles afectan la lanosterol 14-desmetilasa (citocromo P450 51, CYP51) [116]. Otro problema creciente es la aparición de cepas de levaduras resistentes debido al uso extensivo y prolongado de antifúngicos [117]. En consecuencia, la búsqueda de nuevos tratamientos antifúngicos efectivos resulta primordial.



Esquema 14. Estructura química de los azoles

1.7.6. Mecanismo de la fotoinactivación a nivel celular

Las propiedades antifúngicas de haematoporfirinas han sido investigadas sobre células levaduriformes y su actividad fotocitotóxica es mayormente promovida por moléculas en medio acuoso [118]. Luego de la irradiación, el sensibilizador causa una alteración limitada de la membrana citoplasmática que permite la penetración del agente dentro de la célula, la translocación hacia la membrana interna y el consecuente fotodaño de blancos intracelulares [119].

Debe tenerse presente que en condiciones favorables el crecimiento sigue una curva exponencial, y una pequeña cantidad de levaduras puede en poco tiempo restablecer la infección. Por lo tanto, la eficiencia del proceso de fotosensibilización es marcadamente más pronunciada por agentes, que aumentan la penetración hacia el interior celular.

Recientemente, se ha investigado la aplicación de derivados de porfirinas y ftalocianinas en la PDI para tratamiento y control de levaduras. Los cultivos celulares de *C. albicans* fueron inactivados satisfactoriamente por agentes tricatiónicos y tetracatiónicos siendo la organela blanco la membrana citoplasmática [105]. Así, debido a la variedad de aplicaciones terapéuticas que existen surge el interés en este campo y la necesidad de encontrar nuevas moléculas con mejores características para la PDI.

El deterioro sobre la membrana plasmática puede involucrar la pérdida del contenido celular, inactivación de enzimas o disrupción de los sistemas de transporte de la membrana. Por otro lado, es conocido que los sensibilizadores catiónicos intervienen en la formación de complejos con los ácidos nucleicos, induciendo lesiones luego de la fotoactivación. En estos complejos, los residuos de guanina son los más fácilmente oxidables [49,50]. Sin embargo, debe considerarse que en un organismo vivo, el daño a nivel genético puede ser contrarrestado por varios de los sistemas de reparación del ADN [120]. Actualmente, hay estudios sobre las estructuras subcelulares afectadas y sobre la naturaleza del daño al ADN y proteínas causado por el tratamiento de levaduras por la acción fotodinámica. Los trabajos de investigación han centrado su atención sobre posibles daños producidos en el ADN de distintas cepas microbianas sometidas al tratamiento [121]. Sin embargo, aún existe controversia sobre cuáles son las principales estructuras celulares que sufren alteraciones y producen la muerte del microorganismo. Por lo tanto, el mecanismo de la fotoactivación en levaduras no está totalmente establecido. Varios autores han concluido que si bien el daño al ADN ocurre, éste puede no ser la principal causa de la fotoactivación de las células [103,122,123].

1.8. Glóbulos rojos

1.8.1. Características generales de los eritrocitos

La sangre está formada por componentes celulares (leucocitos, eritrocitos y plaquetas) que están suspendidos en el plasma (Figura 11).

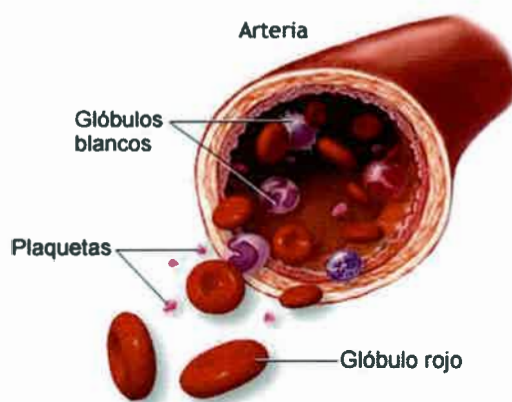


Figura 11. Corte transversal de una arteria mostrando las diferentes células sanguíneas

El volumen total normal de la sangre circulante es alrededor del 8 % del peso corporal. Las variaciones en sus propiedades y constituyentes reflejan los cambios corporales, incluyendo estados de enfermedad [124].

La médula ósea es la encargada de producir eritrocitos, leucocitos y plaquetas, a partir de una célula madre pluripotenciada. Dentro de las numerosas células de la sangre humana, la mayor parte son eritrocitos, los cuales transportan la hemoglobina durante la circulación (Figura 12).

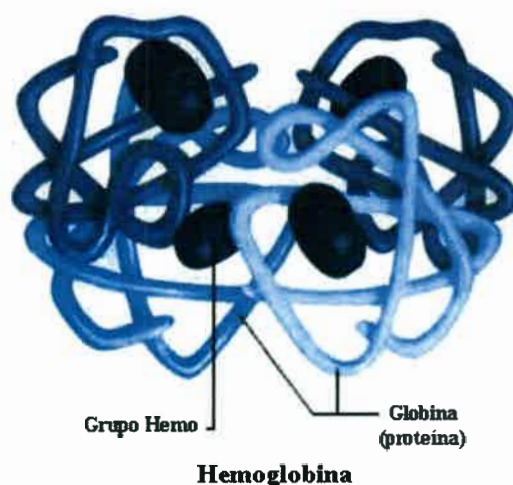


Figura 12. Estructura de la hemoglobina

Los eritrocitos son discos bicóncavos de alrededor de $7,5 \mu\text{m}$ de diámetro y $2 \mu\text{m}$ de grosor, y cada uno contiene alrededor de 29 pg de hemoglobina (Figura 13). La cuenta promedio normal de eritrocitos es de 5,4 millones/mL en hombres y 4,8 millones/mL en mujeres. Estos, al igual que otras células, se encogen en soluciones con presión osmótica mayor a la del plasma normal. En soluciones con una presión osmótica menor, se produce la hemólisis de las células rojas o eritrocateresis. La hemólisis es un fenómeno en el cual los globulos rojos se hinchan, posteriormente adquieren apariencia esférica en vez de discoidal y finalmente pierden la hemoglobina. Una solución 0,9% de NaCl (solución fisiológica) es isotónica con respecto al plasma. Al pH normal del plasma, 7,4, las proteínas se encuentran principalmente en forma aniónica y constituyen una parte importante del complemento aniónico del plasma [125].

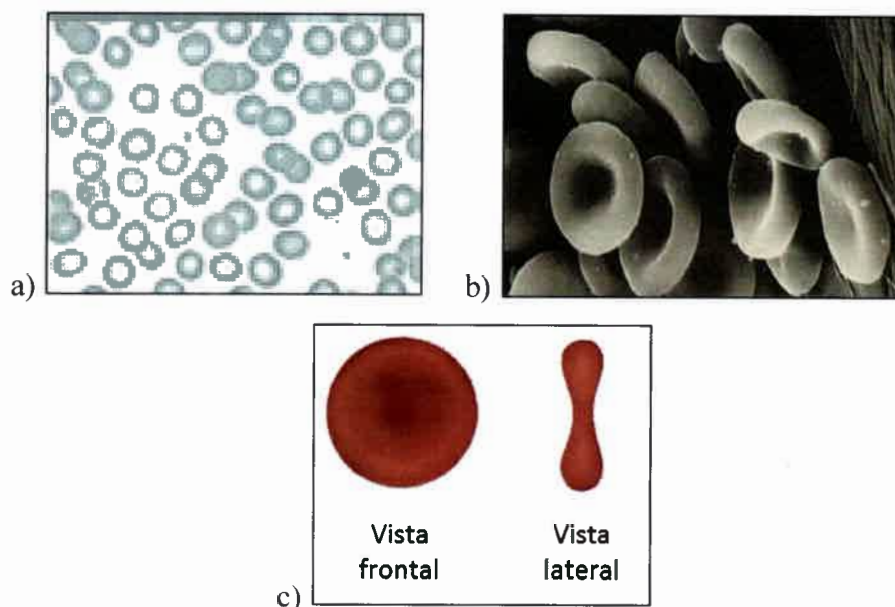


Figura 13. Glóbulos rojos. a) Vista al microscopio óptico. b) Vista al microscopio electrónico de barrido. c) Esquema de la vista frontal y lateral.

1.8.2. Eritrocitos como modelo de células para estudios de PDT

Los eritrocitos sirven como modelos celulares para estudios *in vitro* de PDT. Las células rojas están involucradas en la PDT, ya que: i) la sangre se emplea para transportar el fotosensibilizador a los tejidos [126], ii) Se cree que la generación de especies reactivas del oxígeno, fundamentalmente $^1\text{O}_2$, es el principal mecanismo molecular de la PDT [127] y las células sanguíneas rojas constituyen el sistema de transporte del oxígeno en el cuerpo [128]. El daño celular puede ocurrir mediante especies radicales libres por la lipoperoxidación de las membranas. Además, es sencillo obtener un gran número de eritrocitos, con mínimas consecuencias para el dador [129,130].

La eficiencia de los distintos fotosensibilizadores puede variar significativamente dependiendo del objetivo biológico. La membrana celular es un objetivo importante para numerosos agentes antineoplásicos. En este sentido, los eritrocitos de mamíferos constituyen un sistema modelo atractivo y adecuado para estudiar el fotodaño en las membranas [83].

En estos estudios, las ftalocianinas resultan de gran interés ya que este grupo de sensibilizadores posee la capacidad de absorber luz alrededor de los 670 nm y en esta región la hemoglobina prácticamente no absorbe [131]. Además, los tejidos humanos transmiten la

luz más efectivamente en la región roja del espectro visible, y consecuentemente, la ventana para la penetración óptima es entre 600-800 nm (Figura 3) [12,132].



2. OBJETIVOS



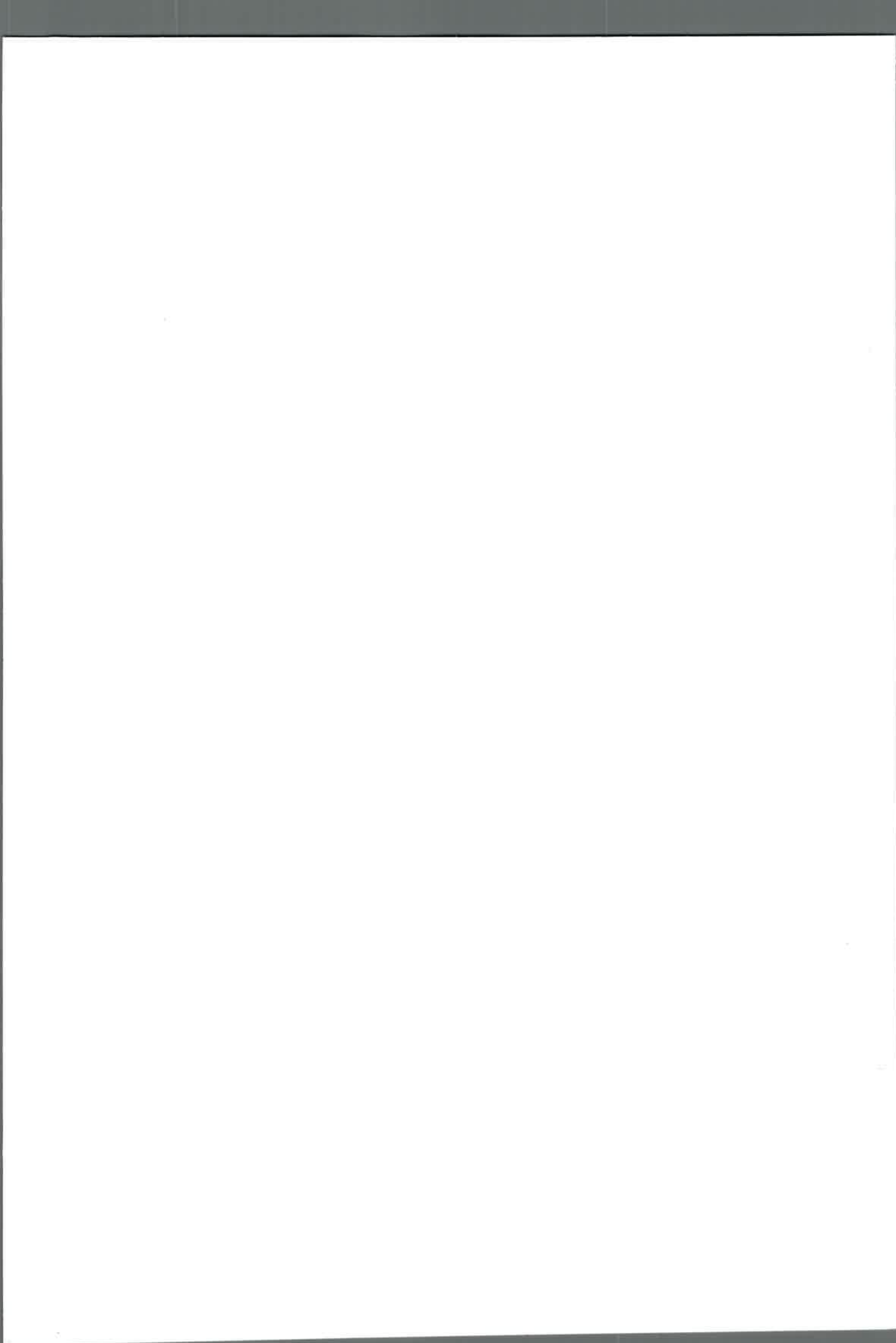
2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Diseñar, sintetizar y caracterizar nuevos agentes fotosensibilizadores derivados de ftalocianinas anfífilas con la finalidad de producir un aporte significativo en la eficiencia y selectividad para la inactivación fotodinámica de sistemas biológicos.

2.2. Objetivos específicos

- a. Sintetizar ftalocianinas A_4 a partir de derivados de ftalonitrilos previamente sustituidos.
- b. Obtener ftalocianinas A_3B mediante la reacción de expansión de subftalocianinas con ftalonitrilos.
- c. Estudiar las características espectroscópicas de absorción y fluorescencia de las ftalocianinas sintetizadas en soluciones homogéneas y microheterogéneas.
- d. Analizar las propiedades fotoquímicas y producción de 1O_2 de los agentes fotosensibilizadores.
- e. Evaluar la actividad fotodinámica de las ftalocianinas sintetizadas en sistemas biomiméticos y biológicos utilizando células de microorganismos y eritrocitos humanos.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales y métodos

3.1. Reactivos y equipamiento general

Los espectros UV-visible y de fluorescencia fueron realizados en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC y en un fluorómetro Spex FluoroMax, respectivamente. Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (^1H NMR) fueron obtenidos en un espectrómetro multinuclear FT-NMR Bruker Avance DPX400 a 400 MHz y en un espectrómetro multinuclear FT-NMR Bruker a 200 MHz. Los espectros de masa (MS) fueron tomados con un equipo Varian Matt 312 operando en el modo EI, a 70 eV y un espectrómetro Bruker MicroQTOFII, equipado con una fuente ESI. Para la cromatografía de capa fina en sílica gel (TLC, thin-layer chromatography), fueron utilizadas placas de 250 μm de Analtech (Newark, DE, USA), mientras que, en las cromatografías en columna *flash* fue utilizada sílica gel 60 (0,063-0,2 mm, 70-230 mesh, Merck). El sonicado fue realizado en un equipo Branson 1210 (Danbury, CT, USA).

Los compuestos acetato de zinc(II), 2-(adamantil)-1-etanol, azida sódica, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), 9,10-dimetilantraceno (DMA), D-manitol, 4-hidroxipiridina, 4-nitroftalónitrilo, 6-(*tert*-butil)-2,3-dicianonaftaleno, tetrafluorftalónitrilo, *t*-butoxido de potasio (*t*-BuOK), tricloruro de boro (BCl_3), sulfuro de sodio nohidratado ($\text{SNa}_2 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) de Aldrich fueron utilizados sin purificación. Bis(2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio (AOT) y cloruro de bencil-*n*-hexadecildimetilamonio (BHDC) de Sigma fueron secados al vacío a temperatura ambiente previo a su utilización.

Los solventes (grado GR) de Sintorgan fueron destilados. Todos los solventes utilizados en estudios espectroscópicos fueron calidad HPLC. El agua ultrapura se obtuvo del equipo Labconco (Kansas, MO, USA) modelo 90901-01.

La absorción de luz por parte de los eritrocitos y cultivos fúngicos fue determinada en un espectrofotómetro Barnstead Turner SP-830.

En los ensayos biológicos fueron utilizados caldo tripticasa soya (CTS), caldo Saboreaut y agar-agar de Britania, los cuales fueron esterilizados en autoclave (AllAmerica, Model 25x-2, Manitowoc, USA) a 20 psi ~ 115 - 121°C durante 20 min. Además, fueron utilizadas cajas de Petri (10 cm de diámetro) estériles descartables.

3.2. Fftalocianinas

Los compuestos zinc(II)ftalocianina (ZnPc) y cloruro de boro(III) subftalocianina (SubPc) fueron adquiridos de Aldrich. La síntesis de Zinc(II) 2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis[metoxi]ftalocianina (M₄ZnPc) fue previamente realizada como se describe en la bibliografía [65].

3.2.1. Síntesis de ftalocianinas

4-[2-(1-Adamantanol)etoxi]ftalonitrilo (APn)

Una mezcla de 2-(1-adamantanol)etanol (97 mg 0,54 mmol), *t*-BuOK, (65 mg, 0,58 mmol) y 4-nitroftalonitrilo (90 mg, 0,52 mmol) en 5 mL de DMSO fue agitada bajo atmósfera de argón. La solución fue agitada por 20 min a temperatura ambiente, diluida con diclorometano (50 mL) y lavada con 0,1 M de NaOH (50 mL). El solvente fue evaporado a presión reducida. El producto fue purificado por cromatografía en columna *flash* (sílica gel, *n*-heptano/diclorometano; 70:30) para dar 113 mg (0,37 mmol), lo que equivale a 72 % de rendimiento del producto APn. ¹HNMR (CDCl₃, TMS) δ [ppm] 1,48 (t, 2H, CH₂CH₂O, J = 6,0 Hz), 1,52 (br, s, 6H, CH₂), 1,68 (br, s, 6H, CH₂), 1,98 (bs, s, 3H, cabeza de puente, CH), 4,10 (t, 2H, CH₂O, J = 6,0 Hz), 7,17 (dd, 1H, J = 2,6 Hz, 9,0 Hz), 7,25 (d, 1H), 7,69 (d, 1H, J = 9,0 Hz). EI-MS [m/z] 306 (M⁺) (306,1732 calculado para C₂₀H₂₂N₂O) [133].

Zinc(II) 2-[2-(1-adamantanol)etoxi]ftalocianina (AZnPc)

Una solución de APn (13 mg 0,042 mmol) y DBU (8 μL, 0,08 mmol) en 2 ml de DMSO fue agitada y calentada a 130 °C en atmósfera de argón. Luego, una suspensión de SubPc (43 mg, 0,10 mmol), acetato de zinc dihidrato (30 mg, 0,137 mmol) en DMSO/1-cloronaftaleno (2 mL, 2:1) fue agregada lentamente durante 1 h. La reacción fue mantenida a 130-140 °C por 24 h. Posteriormente, la mezcla de reacción fue enfriada a temperatura ambiente y precipitada con éter etílico. El sólido fue separado por centrifugación. El producto

fue purificado por cromatografía en columna *flash* (sílica gel, heptano/diclorometano) para obtener 10 mg (0,013 mmol) de AZnPc con un rendimiento de 15 %. $^1\text{HNMR}$ (CDCl_3 , TMS) δ [ppm] 1,50-1,80 (m, 14H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ y adamantil CH_2), 1,98 (br, s, 3H, cabeza de puente, CH), 4,25 (t, 2H, CH_2O , $J = 6,0$ Hz), 7,30-8,00 (m, 15H). ESI-MS [m/z] 755,2225 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ (754,2147 calculado para $\text{C}_{44}\text{H}_{34}\text{N}_8\text{OZn}$) [133].

Zinc(II) 2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis[2-(1-adamantil)etoxi]ftalocianina ($A_4\text{ZnPc}$)

De acuerdo al procedimiento de síntesis utilizado, el macrociclo de la ftalocianina fue obtenido como una mezcla de los correspondientes regioisómeros. Una solución de APn (20 mg, 0,065 mmol) y acetato de zinc(II) dihidratado (11 mg, 0,050 mmol) en 2 ml de *n*-pentanol fue agitado a 90 °C por 10 min en atmósfera de argón. Luego, fueron agregado 10 μL de DBU (0,10 mmol) a la mezcla de reacción. La solución fue agitada a reflujo durante 15 h en atmósfera de argón y posteriormente fue enfriada a temperatura ambiente. El producto fue precipitado con metanol, luego el sólido fue separado por centrifugación y secado al vacío para producir 6 mg de $A_4\text{ZnPc}$ con un 27% de rendimiento. $^1\text{HNMR}$ (CDCl_3 , TMS) δ [ppm] 1,50-1,80 (m, 56H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ y adamantil CH_2), 1,99 (br, s, 12H, cabeza de puente, CH), 4,10-4,20 (m, 8H, CH_2O), 7,30-8,00 (m, 12H). ESI-MS [m/z] 1323,5909 ($\text{M}+\text{Cl}$) $^-$ (modo negativo) (1288,6220 calculado para $\text{C}_{80}\text{H}_{88}\text{N}_8\text{O}_4\text{Zn}$) [133].

4-[4-Piridiloxi]ftalonitrilo (PPn)

Una solución de 4-nitroftalonitrilo (502 mg, 2,9 mmol) y 4-hidroxipiridina (306 mg, 3,2 mmol) en 15 mL de DMF fue agitada por 10 min en atmósfera de argón. Luego, fue agregado K_2CO_3 anhidro (2 g, 14,5 mmol) y la solución fue calentada a 90 °C durante 5 h. La mezcla fue tratada con agua (50 mL) y la fase orgánica extraída con diclorometano (tres porciones de 50 mL cada una). El solvente fue evaporado a presión reducida. El producto fue purificado por cromatografía en columna *flash* (sílica gel, diclorometano/metanol 15%) rindiendo 227 mg (36%) de PPn. TLC (sílica gel) R_f (diclorometano/metanol 10%) = 0,45. Los datos espectroscópicos se corresponden con los publicados previamente [86].

Zinc(II) 2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis[4-(N-metilpiridiloxi)]ftalocianina (P₄ZnPc⁴⁺)

La ftalocianina P₄ZnPc⁴⁺ fue obtenida a partir del procedimiento establecido previamente [86]. La síntesis consta de dos etapas, en la primera una solución de PPn (400 mg 1,81 mmol), acetato de zinc(II) dihidrato (110 mg, 0,50 mmol) en 15 mL de *n*-pentanol fue agitada por 10 min bajo atmosfera de argón. Luego fueron adicionados 300 µL de DBU (2,01 mmol) y la mezcla fue mantenida a reflujo durante 18 h. El producto de la reacción fue purificado por precipitación con ciclohexano y lavado con agua para obtener la zinc(II)2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis[4-(piridiloxi)]ftalocianina (P₄ZnPc) con un 68% de rendimiento. En segundo lugar, una mezcla de P₄ZnPc (240 mg, 0,25 mmol) y 20 mL de yoduro de metilo en 10 mL de acetona fue agitado durante 72 h a reflujo. Posteriormente, los solventes fueron evaporados a presión reducida y el sólido fue resuspendido en ciclohexano y filtrado. Los cristales fueron lavados con hexano, dietiléter y acetona para producir 360 mg (95%) de P₄ZnPc⁴⁺. Los datos espectroscópicos coinciden con los informados en trabajos previos [86].

Zinc(II) 2-[4-piridiloxi]ftalocianina (PZnPc)

Una solución de PPn (30 mg, 0,126 mmol) y DBU (10 µL, 0,1 mmol) en 2 mL de DMSO fue agitada y calentada a 130 °C en atmósfera de argón. Luego, una suspensión de SubPc (130 mg, 0,3 mmol), acetato de zinc(II) dihidratado (30 mg, 0,136 mmol) en DMSO/1-cloronaftaleno (2 mL, 2:1) fue adicionada lentamente durante 1 h. La reacción fue mantenida a 130 °C por 24 h. Posteriormente, la mezcla de reacción fue enfriada a temperatura ambiente y precipitada con agua. El sólido fue separado por centrifugación. El producto fue purificado por cromatografía en columna *flash* (sílica gel, diclorometano/metanol) para obtener 20 mg (23%) de PZnPc. ¹H NMR (DMSO-d₆, TMS) δ [ppm] 6.2 (d, 2H), 7,30-8,00 (m, 15H), 8.1-9.4 (m, 4H). ESI-MS [m/z] 670,1082 (M+H)⁺ (669,1004 calculado para C₃₇H₁₉N₉OZn).

Zinc(II)2-[4-(N-metilpiridiloxi)ftalocianina (PZnPc⁺)

PZnPc (18 mg, 0,027 mmol) fue tratada con un exceso de yoduro de metilo (2 mL) en 2 mL de acetona durante 72 h a 60 °C. El solvente fue evaporado a presión reducida. El producto fue lavado con ciclohexano para obtener 20 mg (94%) de *PZnPc⁺*. ¹HNMR (DMSO-d₆, TMS) δ [ppm] 4.2 (m, 3H,-CH₃), 7,30-9.5 (m, 19H). ESI-MS [m/z] 685,1317 (M+H)⁺ (684,1233 calculado para C₃₈H₂₂N₉OZn).

Cloro [2,9,16(17)-trinitrosubftalocianinato] boro(III) (SubNPc)

La síntesis de *SubNPc* fue llevada a cabo como se describe en bibliografía [134]. La formación de *SubNPc* fue realizada mediante la condensación del 4-nitroftalonnitrilo (343 mg, 1,98 mmol) con BCl₃ (2 mL de una solución 1 M en xilenos). La mezcla, en atmósfera de argón, fue introducida en un baño a 130°C y se mantuvo la reacción a esa temperatura por 50 min. Luego, el solvente fue evaporado a presión reducida. La mezcla fue separada por cromatografía en columna (sílica gel, tolueno/acetato de etilo 10%). Fueron obtenidos 194 mg de la subftalocianina con un rendimiento del 68 %. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía [135].

Zinc(II) 2-[2-(1-adamantil)etoxi]-9(10),16(17),23(24)-tris(nitro)ftalocianina (AN₃ZnPc)

Una solución de APn (184 mg, 0,60 mmol) y DBU (30 μL, 0,30 mmol) en 2 ml de DMSO fue agitada y calentada a 115 °C en atmósfera de argón. Luego, una suspensión de *SubNPc* (314 mg, 0,55 mmol), acetato de zinc dihidrato (80 mg, 0,36 mmol) en DMSO/1-cloronaftaleno (2 mL, 2:1) fue adicionada lentamente durante 1 h. La reacción fue mantenida a 120 °C por 1 h. Posteriormente, la mezcla de reacción fue enfriada a temperatura ambiente y precipitada con agua. El producto de la reacción fue purificado por lavado con agua y ciclohexano. El sólido fue separado por centrifugación y secado al vacío para obtener 98 mg (0,112 mmol) de *AN₃ZnPc* con un rendimiento de 20 %. ESI-MS [m/z] 890,1778 (M+H)⁺ (889,1699 calculado para C₄₄H₃₁N₁₁O₇Zn).

Zinc(II) 2-[2-(1-adamantil)etoxi]-9(10),16(17),23(24)-tris(amino)ftalocianina (AN₃ZnPc)

AN₃ZnPc (29 mg, 0,033 mmol) fue tratada con un exceso de Na₂S (1,6 g, 6,7 mmol) durante 1 h a 60 °C en 5 mL de DMF. La mezcla de reacción fue precipitada en 50 mL de agua, centrifugada y lavada con agua, para obtener 18 mg (0,022 mmol, 7268%) de AN₃ZnPc. ESI-MS [m/z] 800,2552 (M+H)⁺ (799,2474 calculado para C₄₄H₃₇N₁₁OZn).

Zinc(II) 2-[2-(1-adamantil)etoxi]-9(10),16(17),23(24)-tris(N,N,N-trimetilamonio)ftalocianina (AN₃ZnPc³⁺)

AN₃ZnPc (16 mg, 0,019 mmol) fue tratada con un exceso de yoduro de metilo (2 mL) en 2 mL de DMF durante 48 h a 55 °C. El solvente fue evaporado a presión reducida. El producto fue lavado con ciclohexano. La reacción fue llevada a cabo con un 95% de rendimiento. ¹H NMR (DMSO-d₆, TMS) δ [ppm] 1,48-1,85 (m, 14H, CH₂CH₂O y adamantil CH₂), 1,97 (br, s, 3H, cabeza de puente, CH), 3,63 (s, 27 H), 4,27 (t, 2H, CH₂O, J = 5,8 Hz), 7,43-8,96 (m, 12H). ESI-MS [m/z] 929,4196 (M+H)⁺ (928,4101 calculado para C₅₃H₅₈N₁₁OZn).

Zinc(II) 2,3-[2'-tert-butil-1',3'-butadienil]-9(10),16(17),23(24)-tris(nitro)ftalocianina (TN₃ZnPc)

Una solución de 5-terbutil-1,2-naftalenftalonitrilo (120 mg, 0,51 mmol) y DBU (30 µL, 0,30 mmol) en 2 mL de DMSO fue agitada y calentada a 115 °C en atmósfera de argón. Luego, una suspensión de SubNPc (273 mg, 0,48 mmol), acetato de zinc(II) dihidratado (73 mg, 0,33 mmol) en DMSO/1-cloronaftaleno (2 mL, 2:1) fue adicionada lentamente durante 1 h. La reacción fue mantenida a 120 °C por 1 h. Posteriormente, la mezcla de reacción fue enfriada a temperatura ambiente y precipitada con agua. El producto de la reacción fue purificado por lavado con agua y ciclohexano. El sólido fue separado por centrifugación. El producto fue obtenido por secado al vacío para obtener 59 mg (0,072 mmol) de TN₃ZnPc con un rendimiento de 15 %. ESI-MS [m/z] 818,1202 (M+H)⁺ (817,1124 calculado para C₄₀H₂₃N₁₁O₆Zn).

Zinc(II)2,3-[2'-tert-butyl-1',3'-butadienyl]-9(10),16(17),23(24)-tris(amino)ftalocianina (TNH₃ZnPc)

TN₃ZnPc (28 mg, 0,036 mmol) fue tratada con un exceso de Na₂S (1,5 g, 6,2 mmol) durante 1 h a 60 °C en 5 mL de DMF. La mezcla de reacción fue precipitada en 50 mL de agua. Posteriormente, el sólido fue centrifugado y lavado con agua. Fueron obtenidos 16 mg (0,021 mmol, 59 %) de TNH₃ZnPc. ESI-MS [m/z] 728,1977 (M+H)⁺ (727,1899 calculado para C₄₀H₂₉N₁₁Zn).

Zinc(II)2,3-[2'-tert-butyl-1',3'-butadienyl]-9(10),16(17),23(24)-tris(N,N,N-trimetilamonio)ftalocianina (TN₃ZnPc³⁺)

TNH₃ZnPc (13 mg, 0,027 mmol) fue tratada con un exceso de yoduro de metilo (2 mL) en 2 mL de DMF durante 48 h a 60 °C. El solvente fue evaporado a presión reducida. El producto fue lavado con ciclohexano. La reacción fue llevada a cabo con un 96 % de rendimiento. ¹H NMR (DMSO-d₆, TMS) δ [ppm] 1,49 (s, 9H), 3,89 (s, 27H), 7,44-9,56 (m, 14H). ESI-MS [m/z] 857,3620 (M+H)⁺ (856,3526 calculado para C₄₉H₅₀N₁₁Zn).

Zinc(II) 1,2,3,4-[tetrafluoro]-9(10),16(17),23(24)-tris(nitro)ftalocianina (FN₃ZnPc)

Una solución de tetrafluorftalonitrilo (98 mg, 0,49 mmol) y DBU (30 µL, 0,30 mmol) en 2 mL de DMSO fue agitada y calentada a 115 °C en atmósfera de argón. Luego, una suspensión de SubNPc (265 mg, 0,47 mmol), acetato de zinc dihidrato (70 mg, 0,31 mmol) en DMSO/1-cloronaftaleno (2 mL, 2:1) fue adicionada lentamente durante 1 h. La reacción fue mantenida a 120 °C por 1 h. Posteriormente, la mezcla de reacción fue enfriada a temperatura ambiente y precipitada con agua. El producto de la reacción fue purificado por lavado con agua y ciclohexano. El sólido fue separado por centrifugación y secado al vacío para obtener 63 mg (0,081 mmol) de FN₃ZnPc con un rendimiento de 16 %. ESI-MS [m/z] 784,0043 (M+H)⁺ (782,9965 calculado para C₃₂H₉F₄N₁₁O₆Zn).

Zinc(II) 1,2,3,4-[tetrafluoro]-9(10),16(17),23(24)-tris(amino)ftalocianina (FNH₃ZnPc)

FN₃ZnPc (24 mg, 0,031 mmol) fue tratada con un exceso de Na₂S (1,6 g, 6,7 mmol) durante 1 h a 60 °C en 5 mL de DMF. La mezcla de reacción fue precipitada en 50 mL de agua y centrifugada. Luego el sólido fue lavado con agua para obtener 15 mg (0,021 mmol, 66 %) de FNH₃ZnPc. ESI-MS [m/z] 694,0918 (M+H)⁺ (693,0739 calculado para C₃₂H₁₅F₄N₁₁Zn).

Zinc(II) 1,2,3,4-[tetrafluoro]-9(10),16(17),23(24)-tris(N,N,N-trimetilamonio)ftalocianina (FN₃ZnPc³⁺)

FNH₃ZnPc (13 mg, 0,018 mmol) fue tratada con un exceso de yoduro de metilo (2 mL) en 2 mL de DMF durante 48 h a 60 °C. El solvente fue evaporado a presión reducida. El producto fue lavado con ciclohexano. La reacción fue llevada a cabo con un 94 % de rendimiento. ¹H NMR (DMSO-d₆, TMS) δ [ppm] 3,64 (s, 27H), 7,44-8,98 (m, 9H). ESI-MS [m/z] 823,2461 (M+H)⁺ (822,2366 calculado para C₄₁H₃₆F₄N₁₁Zn).

3.2.2. Preparación de soluciones de ftalocianinas

Una solución de cada uno de los diferentes sensibilizadores fue preparada por disolución del sólido en DMF. La concentración (C) fue determinada por espectroscopía de absorción, mediante la Ley de Lambert-Beer, teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar (ε) de cada ftalocianina.

3.3. Estudios espectroscópicos

Los estudios espectroscópicos fueron realizados a 25,0 ± 0,5°C usando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) fueron calculados según la Ecuación 1, comparando el área obtenida debajo del espectro de emisión

de cada sensibilizador en un solvente adecuado con respecto al área de la referencia (ZnPc $\Phi_F=0,26$) [86].

$$\Phi_F^{\text{Sens}} = \frac{A^{\text{Ref}}}{A^{\text{Sens}}} \frac{I^{\text{Sens}}}{I^{\text{Ref}}} \Phi_F^{\text{Ref}} \quad (1)$$

Donde Φ_F representa el rendimiento cuántico de fluorescencia, A corresponde a la absorbancia medida a la longitud de onda de excitación (λ_{exc}) e I es el área debajo del espectro de emisión para el sensibilizador en estudio (Sens) y el de la referencia (Ref) en un mismo solvente. Estas áreas fueron determinadas utilizando un programa de cálculos (Microcal Origin, Northampton, MA) a partir de los gráficos de intensidad de fluorescencia vs frecuencia [90]. Las medidas de absorbancia fueron determinadas a la longitud de onda de excitación de 610 nm y las áreas de los espectros de emisión se integraron en el rango 630-800 nm.

3.4. Sistemas de irradiación

La irradiación de los sustratos en medio homogéneo y microheterogéneo fue realizado con un proyector Cole-parmer illuminator 41720-series (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) equipado con una lámpara halógena de 150 W, acoplado a un monocromador (Photon Technology Instrument, Birmingham, NJ, USA), como muestra el dispositivo I (Figura 14). La irradiación de eritrocitos y microorganismos fue realizado con un proyector de diapositivas Novamat 130 AF equipado con una lámpara de halógeno de 150 W dispuesto en diferentes configuraciones. El dispositivo II corresponde a los experimentos con glóbulos rojos mientras que el dispositivo III corresponde a los ensayos con microorganismos [136].

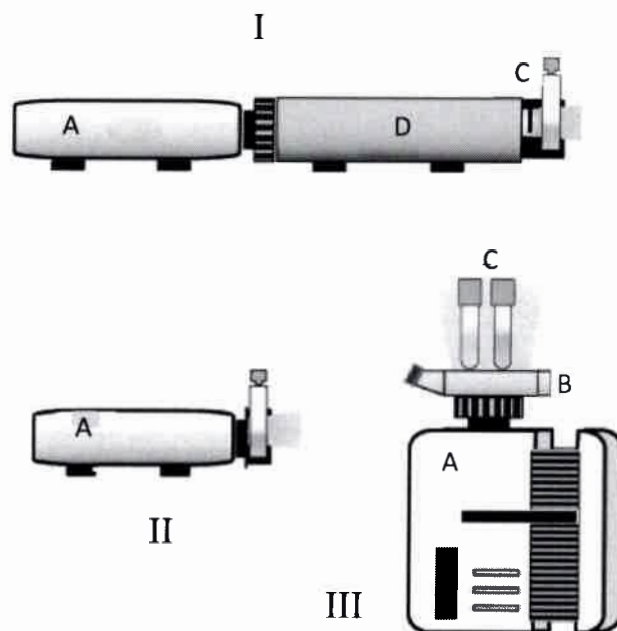


Figura 14. Arreglos de irradiación. I: Fotooxidación de DMA; II: Fotosensibilización de glóbulos rojos; III: Fotosensibilización de células fúngicas. A: proyector, B: filtro de agua, C: muestras, D: monocromador.

3.5. Fotooxidación de 9,10-dimetilantraceno

Estudio en medio homogéneo

Soluciones de 2 ml de DMA (35-45 μM) en presencia de un sensibilizador fueron irradiadas con luz monocromática (absorbancia del fotosensibilizador = 0.2, $\lambda_{\text{irr}} = 670 \text{ nm}$). La intensidad de luz fue de 15 W/m^2 . Las cinéticas de fotooxidación de DMA fueron estudiadas siguiendo la disminución de la absorbancia (A) a $\lambda_{\text{max}}=378 \text{ nm}$. Las constantes de velocidad observadas (k_{obs}) fueron obtenidas por el ajuste lineal de $\ln A_0/A$ vs tiempo. Los valores Φ_{Δ} para cada sensibilizador fueron obtenidos por comparación directa de las pendientes en la región lineal del gráfico del ajuste con un estándar [137]. ZnPc ($\Phi_{\Delta} = 0,56$) fue utilizada como referencia [138,139]. Idénticas condiciones experimentales fueron empleadas para analizar la fotooxidación de DMA en presencia de un determinado fotosensibilizador y la referencia. Para la reacción de DMA con $^1\text{O}_2$ en estado estacionario (Ecuación 1), la velocidad de desaparición del sustrato es expresada mediante la Ecuación 3.



$$\frac{\delta[\text{DMA}]}{\delta t} = -k_r[\text{DMA}][{}^1\text{O}_2] = -k_{\text{obs}}[\text{DMA}] \quad (3)$$

En estado estacionario de irradiación y condiciones aeróbicas, la ${}^1\text{O}_2$ es constante durante el proceso y $k_{\text{obs}} = k_r [{}^1\text{O}_2]$. Integrando la Ecuación 3, se obtiene la Ecuación 4:

$$\ln \frac{[\text{DMA}]_0}{[\text{DMA}]_f} = k_{\text{obs}} t \quad (4)$$

Donde $[\text{DMA}]_0$ y $[\text{DMA}]_f$ representan las concentraciones de DMA a tiempo de reacción cero y a un determinado tiempo de reacción, respectivamente. Reemplazando las concentraciones de DMA por las correspondientes absorbancia a 378 nm se obtiene la Ecuación 5:

$$\ln \frac{A_0}{A_f} = k_{\text{obs}} t \quad (5)$$

El avance de la reacción puede graficarse en forma lineal, de forma tal que el término de la izquierda es la variable dependiente, el tiempo t , la variable independiente, y la pendiente del gráfico k_{obs} .

Estudios en medio microheterogéneo

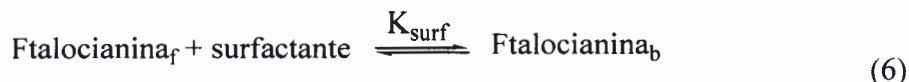
Una solución stock de AOT 0,1 M fue preparada por pesada en *n*-heptano como solvente. La adición de agua a la solución fue realizada empleando una microjeringa previamente calibrada. La cantidad de agua fue expresada como la relación molar entre la concentración de agua y de AOT presentes en la micela ($W_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$). Por otro lado, una solución stock de BHDC 0,1 M fue preparada por pesada en benceno como solvente. La

cantidad de agua fue expresada como la relación molar entre la concentración de agua y de BHDC presentes en la micela ($W_0=[\text{H}_2\text{O}]/[\text{BHDC}]$). En todos los experimentos se usó un valor de $W_0=10$. Las mezclas fueron tratadas con ultrasonido para obtener sistemas micelares transparentes. Una solución stock de las micelas (2 mL de solución 0,1 M, $W_0=10$) fue transferida a una celda de cuarzo de paso óptico de 1 cm y cantidades apropiadas de ftalocianina y DMA fueron adheridas.

Las cinéticas de fotooxidación de DMA en micelas inversas de *n*-heptano/AOT /agua y benceno/BHDC fueron estudiadas siguiendo el procedimiento descrito anteriormente en los estudios en medio homogéneo.

Las constantes de distribución de la ftalocianina en el medio micelar (K_{surf}) fueron estudiadas siguiendo la variación de la absorbancia de la ftalocianina a diferentes concentraciones de surfactante a $W_0 = 10$. Las mezclas fueron sonicadas 10 s para obtener soluciones micelares transparentes.

La interacción de las ftalocianinas con las micelas fue analizada mediante espectroscopía de absorción variando la concentración del surfactante. A medida que aumenta la concentración de surfactante se observa un incremento en la intensidad de la banda *Q* de la ftalocianina. Este efecto puede ser atribuido a la asociación entre la ftalocianina y la micela (Ecuación 6).



La constante de asociación K_{surf} fue determinada usando el modelo de *pseudo* fase según la Ecuación 7:

$$K_{\text{surf}} = \frac{[\text{Pc}]_b}{[\text{Pc}]_f [\text{surf}]} \quad (7)$$

Donde $[\text{Pc}]_b$ y $[\text{Pc}]_f$ son las concentraciones de la ftalocianina unida a la micela y libre respectivamente, y $[\text{surf}]$ es la concentración total de surfactante. Los cambios espectrales fueron analizados a partir de la ecuación de Ketelaar (Ecuación 8) [140].

$$\frac{1}{A - A_{\text{Hp}}} = \frac{1}{(\epsilon_b - \epsilon_{\text{Hp}})[\text{Pc}]_0} + \frac{1}{(\epsilon_b - \epsilon_{\text{Hp}})[\text{Pc}]_0 K_{\text{surf}} [\text{surf}]} \quad (8)$$

Donde $[\text{Pc}]_0$ es la concentración total de ftalocianina, A es la absorbancia a diferentes concentraciones del surfactante $[\text{surf}]$, A_{Hp} es la absorbancia del sensibilizador en *n*-heptano, ϵ_b y ϵ_{Hp} son los coeficientes de absortividad molar para la ftalocianina unida a la interfase micelar y en el solvente orgánico respectivamente. Un gráfico del término de la izquierda de la Ecuación 8 vs. $1/[\text{surf}]$ permite determinar el valor de K_{surf} a partir de la relación entre la ordenada al origen y la pendiente. Cabe destacar que para que la ecuación se cumpla la $[\text{AOT}]$ debe ser 100 veces mayor que la $[\text{Pc}]$.

3.6. Fotooxidación del azul de nitro-tetrazolio

El método del azul de nitro-tetrazolio (NBT) fue empleado para detectar la formación de radical anión superóxido (O_2^-) [141]. Las soluciones de NBT (0,2 mM), nicotinamida adenina dinucleótido (β -NADH, 0,5 mM) y ftalocianina (10 μM) en 2 ml de *n*-heptano/AOT (0,1 M)/agua ($W_0=10$) fueron irradiadas con luz blanca bajo condiciones aeróbicas. El progreso de la reacción fue controlado siguiendo el incremento de la absorbancia a $\lambda=560$ nm. Los controles experimentales se realizaron en ausencia de NBT, NADH o ftalocianina.

3.7. Ensayos en *Candida albicans*

3.7.1. Cultivos de la cepa fúngica

Una cepa de *C. albicans* (PC31) fue aislada a partir de una muestra clínica de lesión en piel humana [90]. La levadura fue cultivada en aerobiosis durante toda la noche (overnight, ON) en caldo Sabouraud (CS) (Britania, Buenos Aires, Argentina) a 37 °C hasta alcanzar la fase estacionaria. Un alícuota (1 mL) del cultivo fue asépticamente transferido a un medio fresco y fluido de CS (3 mL). Las células fueron obtenidas por centrifugación del caldo de cultivo (3000 rpm por 15 min) y resuspendidas en 4 mL de solución reguladora salina de fosfato (PBS) 10 mM (pH=7), correspondiente a $\sim 10^7$ unidades formadoras de colonia

(UFC)/mL. Las células fueron diluidas apropiadamente para obtener $\sim 10^6$ UFC/mL en PBS. En todos los experimentos, se emplearon 2 mL de la suspensión celular contenidos en tubos tipo Pyrex (13x100 mm) y la ftalocianina fue adicionada a partir de una solución *stock* 0,5 mM en DMF. El recuento de células viables de *C. albicans* fue realizado en superficie mediante la formación de colonias en placas de Petri conteniendo agar Sabouraud, luego de 48 h de incubación a 37 °C. En general, la sobrevivencia celular se expresa en log de las UFC/ml. En la mayoría de los casos se utilizaron cultivos de 1×10^6 UFC/ml, lo que los controles se representan con 6 unidades de log. Así, el 100 % de inactivación corresponde a una disminución de 6 log.

3.7.2. Inactivación fotodinámica de *C. albicans*

Suspensiones de células de *C. albicans* (2 mL, $\sim 1 \times 10^6$ UFC/mL) en PBS fueron incubadas con la concentración apropiada de la ftalocianina durante 30 min en la oscuridad a 37°C. Luego, los cultivos fueron expuestos a la luz visible por diferentes intervalos de tiempo. La intensidad de la luz utilizada fue de 30 mW/cm² a 670 nm. El dispositivo utilizado fue descrito en la Figura 15. Los experimentos de control incluyeron ensayos en presencia de la ftalocianina sin iluminación, ensayos sin el agregado del fotosensibilizador e irradiados y un ensayo control sin fotosensibilizador ni irradiación. Las suspensiones celulares fueron diluidas en forma consecutiva con PBS y cada dilución fue sembrada por duplicado en placas de agar Sabouraud, para luego contar las UFC luego de ~ 48 h de incubación a 37°C. Cada experimento fue repetido separadamente tres veces.

3.7.3. Unión del sensibilizador a las células de *C. albicans*

Unión del sensibilizador P₄ZnPc⁴⁺

Las suspensiones de *C. albicans* (2 ml, $\sim 10^6$ UFC/mL) en PBS fueron incubadas a diferentes tiempos (15 y 30 min) en la oscuridad a 37°C con 5 y 10 μ M del sensibilizador. Los cultivos fueron centrifugados (3000 rpm por 15 min) y resuspendidos en 2 mL de solución acuosa de SDS (2 %). Luego, fueron incubadas durante la noche a 4°C y sonicadas durante 30

min. La concentración del sensibilizador en el sobrenadante fue medida por espectrofluorimetría ($\lambda_{exc}=670\text{nm}$, $\lambda_{em}=684\text{nm}$). Los valores de fluorescencia obtenidos de cada muestra fueron referidos al número total de células contadas en la suspensión. La concentración del sensibilizador en la muestra fue estimada por comparación con una curva de calibración obtenida con soluciones estándar del sensibilizador en SDS al 2 %, (pendiente= $2,9 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$, Figura 15).

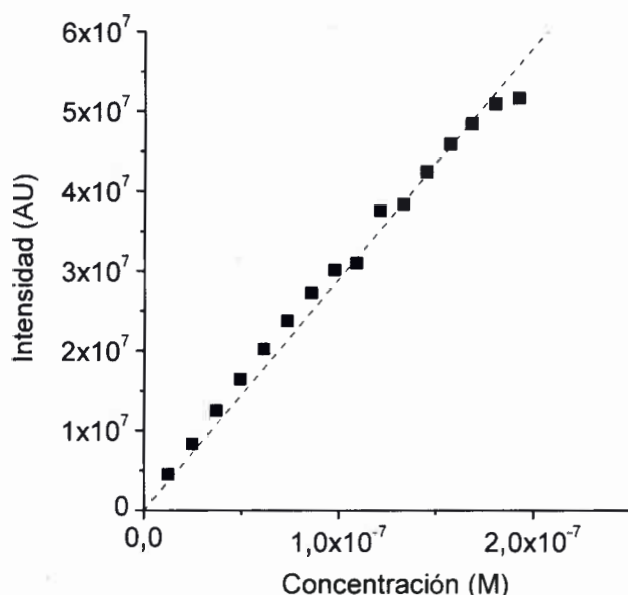


Figura 15. Curva de calibración de $\text{P}_4\text{ZnPc}^{4+}$ en SDS al 2 % ($\lambda_{exc} = 670\text{nm}$, $\lambda_{em} = 684 \text{ nm}$)

Unión del sensibilizador $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$

Suspensiones celulares de *C. albicans* (2 ml, $\sim 10^6$ UFC/mL) en PBS fueron incubadas a diferentes tiempos (2,5; 5; 15 y 30 min). en la oscuridad a 37°C con 1, 5 y 10 μM del fotosensibilizador. Los cultivos fueron centrifugados (3000 rpm por 15 min) y resuspendidos en 2 ml de solución acuosa de 2% p/v SDS con $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$. La concentración del sensibilizador en el sobrenadante fue medida por espectrofluorimetría ($\lambda_{exc}=670\text{nm}$, $\lambda_{em}=684\text{nm}$). Los valores de fluorescencia obtenidos de cada muestra fueron referidos al número total de células contadas en la suspensión. La concentración del sensibilizador en la muestra fue estimada por comparación con una curva de calibración obtenida con soluciones estándar del sensibilizador en 2% p/v SDS (pendiente: $2,7 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$, Figura 16).

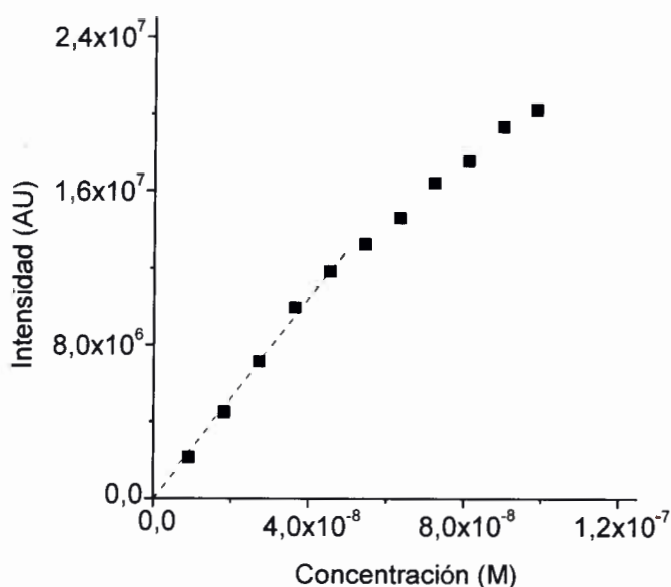


Figura 16. Curva de calibración de $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ en 2% p/v SDS ($\lambda_{\text{exc}} = 670 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 684 \text{ nm}$)

3.7.4. Efecto fotosensibilizado sobre la curva de crecimiento de *C. albicans*

Suspensiones de células de *C. albicans* fueron cultivadas toda la noche como se describió anteriormente. Una porción (1 mL) de este cultivo fue transferido a 20 mL de medio fresco Sabouraud. La suspensión fue homogenizada y alícuotas de 2 mL fueron incubadas con distintas concentraciones del fotosensibilizador a 37 °C. El crecimiento del cultivo fue medido por turbidez a 550 nm usando un espectrofotómetro Tuner SP-830. Luego, los cultivos fueron expuestos por diferentes intervalos de tiempo a luz visible (30 mW/cm²). El dispositivo utilizado fue descrito en la Figura 14. Experimentos de control fueron realizados en presencia de sensibilizador sin iluminación, con irradiación sin sensibilizador y sin sensibilizador en la oscuridad. Cada experimento fue repetido separadamente tres veces.

La Figura 17 muestra los cambios en la absorbancia a 650 nm para el crecimiento aeróbico de *C. albicans* en CS a 37°C. La curva de crecimiento presentó una primera fase de latencia (fase *lag*), en la cual la cepa fúngica se adapta a las nuevas condiciones nutritivas; seguida por la fase exponencial (fase *log*) de crecimiento y por último la fase estacionaria, en la cual, en un sistema de cultivo cerrado, no hay un cambio significativo en el número de células. El comportamiento observado en el crecimiento de esta cepa de *C. albicans* es el

esperado para este grupo de levaduras, alcanzando una absorbancia de ~1,6 en fase estacionaria.

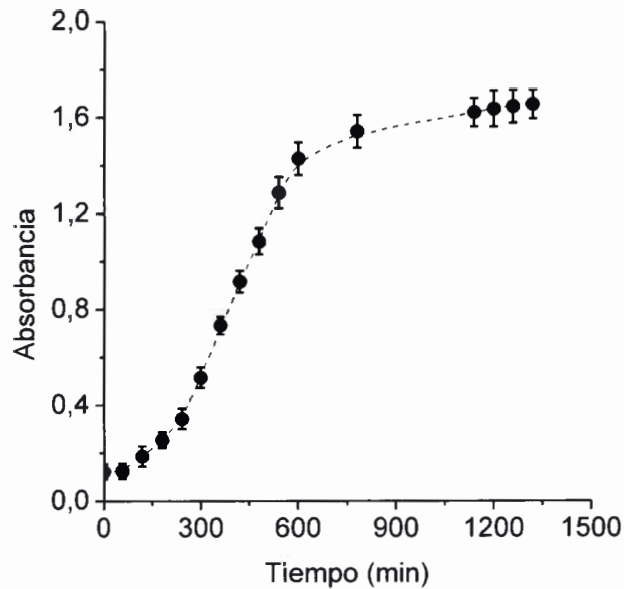


Figura 17. Curva de crecimiento de *C. albicans* en condiciones aeróbicas, en medio CS a 37°C ($\lambda_{\text{abs}} = 650 \text{ nm}$).

3.8. Ensayos con glóbulos rojos

3.8.1. Preparación de las suspensiones de glóbulos rojos

Para estos ensayos fue utilizada sangre completa del Grupo 0 Factor Rh (+), extraída por punción venosa de donantes sanos asistentes al Centro de Salud de la UNRC. La sangre con anticoagulante (citrato), fue centrifugada (3000 rpm durante 5 min) para extraer por aspiración la delgada capa de leucocitos y el plasma (Figura 18), los glóbulos rojos fueron mantenidos a 4°C hasta su uso. El pellet, conteniendo las células rojas, fue lavado con solución amortiguadora de fosfatos (PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, Na_2HPO_4 8 mM) y centrifugado nuevamente. Después de descartar el sobrenadante, los eritrocitos fueron resuspendidos en 50 mL de una solución de NaCl 0,9%, para obtener una concentración de 10^6 células rojas/mL, y fueron conservados a 4 °C.

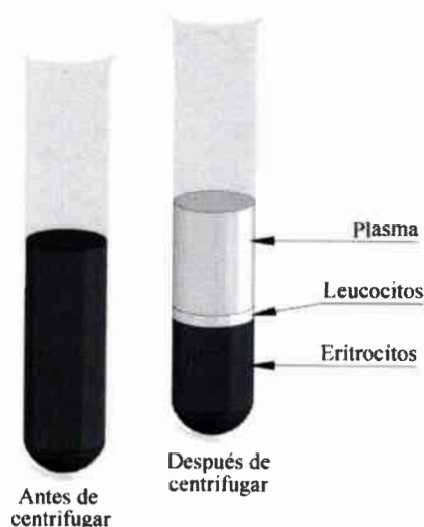


Figura 18. Separación por centrifugación de los diferentes tipos celulares contenidos en la sangre.

3.8.2. Fotohemólisis

En todos los ensayos, 2 mL de la suspensión de glóbulos rojos ($\sim 10^6$ células/mL) fueron colocados en tubos de ensayo junto a 5 μM de los fotosensibilizadores en estudio. Estos fueron mantenidos durante 30 min en la oscuridad para permitir su incorporación, y posteriormente fueron irradiados durante diferentes tiempos. La absorbancia a 413 nm del ensayo sin ftalocianina e irradiado fue empleado como blanco (A_b). La absorbancia de un tubo sin sensibilizador fue centrifugado y resuspendido en agua destilada fue tomado como referencia de 100% de hemólisis ($A_{100\%}$). Las soluciones fueron mantenidas en la oscuridad a temperatura ambiente durante toda la noche. Luego, fueron centrifugadas y 100 μL del sobrenadante fueron colocados en 2 mL de agua destilada para determinar el contenido de hemoglobina, midiendo la absorbancia a 413 nm (A_{hem}). El resultado fue expresado como porcentaje de hemólisis, como se muestra en la Ecuación 9 [83].

$$\% \text{ hemólisis} = \frac{A_{\text{hem}} - A_b}{A_{100\%} - A_b} \times 100 \quad (9)$$

3.8.3. Fragilidad osmótica

Las células rojas (2 mL) fueron incubadas durante 30 minutos en la oscuridad con 5 μM de los sensibilizadores. Luego fueron irradiadas durante 2 min en iguales condiciones a las anteriormente mencionadas. Posteriormente, 100 μL de cada uno de los experimentos fue resuspendido en las distintas soluciones de NaCl (0,2-0,9 % p/v) tamponada con fosfato de sodio 5 μM (pH 7,4). Los distintos ensayos fueron mantenidos en la oscuridad a temperatura ambiente durante 24 h. Luego las muestras fueron centrifugadas. Un ensayo en el cual las células fueron mantenidas en PBS fue considerado el blanco, mientras que la resuspensión de los glóbulos rojos en la solución de NaCl 0,2% p/v en agua fue tomada como 100% de hemólisis.

3.8.4. Mecanismo de acción fotodinámica en glóbulos rojos

Las suspensiones de glóbulos rojos (2 mL) fueron incubadas en la oscuridad durante 30 min con 5 μM del fotosensibilizador y con un agregado de azida (50 mM) o de D-manitol (50 mM) [142]. Luego, fueron irradiadas como indica el dispositivo II (Figura 14) e incubadas en la oscuridad a temperatura ambiente durante toda la noche. Las suspensiones fueron centrifugadas y el porcentaje de hemoglobina fue determinado midiendo la absorbancia a 413 nm. Los resultados fueron expresados como porcentaje de hemólisis, tomando como 100% de hemólisis la absorbancia obtenida de un ensayo lisado en agua destilada.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4. Resultados y discusión

4.1. Estudios de AZnPc, A₄ZnPc y M₄ZnPc

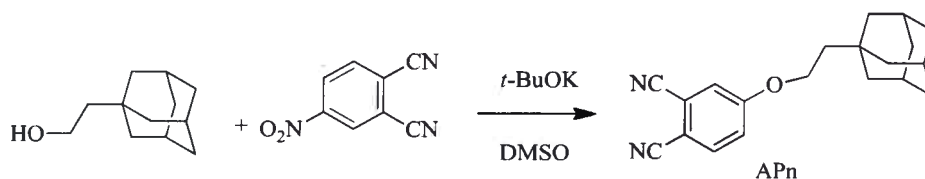
4.1.1. Síntesis de ftalocianinas

Dos nuevas ftalocianinas sustituidas por el grupo 2-(1-adamantil)etoxi fueron sintetizadas a partir del derivado de ftalonitrilo APn. Por un lado la AZnPc con simetría A₃B fue obtenida mediante la reacción de expansión del anillo de la SubPc. Mientras que la ftalocianina A₄ZnPc, con simetría A₄, fue sintetizada mediante la reacción de ciclotetramerización a partir del ftalonitrilo.

Los derivados de adamantano constituyen una clase significativa de agentes farmacológicos importantes que exhiben una variedad de actividades terapéuticas, tales como antiviral, antibacterial, tripanocidal, anticancerígeno y anti-Parkinson [143,144]. El aumento en la hidrofobicidad mediante la incorporación de una unidad de adamantano abre nuevas posibilidades en el diseño de drogas con actividad biológica [145].

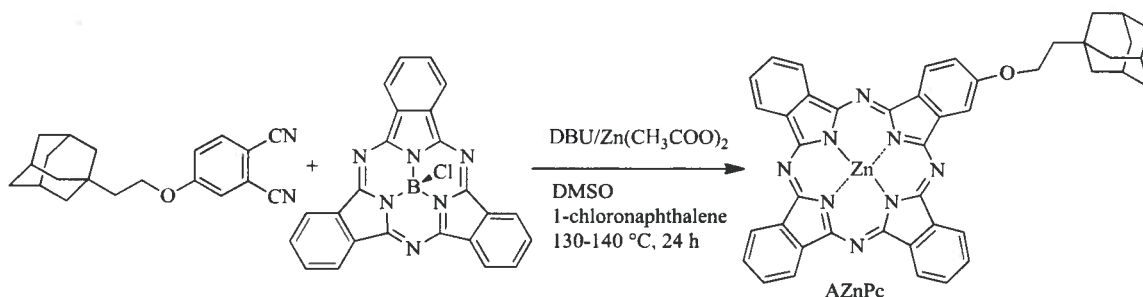
La expansión del anillo de una SubPc, a diferencia de la condensación estadística, es una estrategia selectiva que permite obtener como único producto la ftalocianina deseada. El empleo de esta ruta permite obtener mejores rendimientos y evitar el uso de técnicas cromatográficas para separar mezcla de distintas ftalocianinas [67]. De esta manera, es considerada la metodología más adecuada para la preparación de la AZnPc.

La síntesis de la ftalocianina AZnPc, sustituida por una unidad de adamantano, fue llevada a cabo utilizando un procedimiento de dos etapas. Primero, el derivado de ftalonitrilo conteniendo una estructura de adamantano (APn) fue preparado mediante la reacción de sustitución nucleofílica aromática (S_NAr) *ipso*-nitro entre 4-nitroftalonitrilo y 2-(1-adamantanil)etanol (Esquema 15). La reacción tiene lugar en presencia de *t*-BuOK a temperatura ambiente. El medio básico es usado para activar las propiedades nucleofílicas del 2-(1-adamantanil)etanol. El derivado dinitrilo APn fue aislado por cromatografía en columna *flash* (silica gel, heptano/diclorometano; 70:30) con un 72% de rendimiento.



Esquema 15. Síntesis del ftalonitrilo APn.

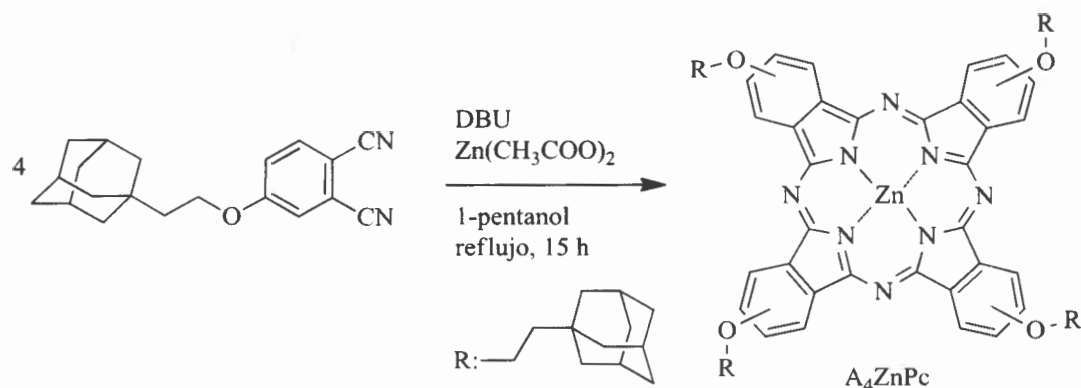
Posteriormente, el ftalonitrilo APn fue utilizado para expandir el anillo de la SubPc. Con este propósito, la mezcla de reacción fue calentada a 130-140 °C durante 24 h, en presencia del catalizador DBU y de acetato de zinc, para producir la formación de la correspondiente AZnPc con un 15 % de rendimiento (Esquema 16). Además, en estudios previos fueron sintetizados derivados de ftalocianinas A_3B conteniendo N-heterociclos de 6 miembros, anillos de piridina y pirazina, siguiendo una metodología similar mediante la expansión de la SubPc [77].



Esquema 16. Síntesis de AZnPc.

Por otra parte, para la obtención de una ftalocianina con estructura A_4 , la expansión de la subftalocianina no es necesaria. El método de síntesis consta de dos etapas, la primera consiste en la obtención del ftalonitrilo APn y la segunda corresponde a la ciclotetramerización. En este método se obtiene un único producto. La reacción de APn con acetato de zinc en presencia de la base orgánica DBU fue realizada en *n*-pentanol (Esquema 17). Este procedimiento permite obtener la ftalocianina A_4ZnPc con un rendimiento del 27 %. Este valor de rendimiento es similar al encontrado previamente para la obtención de ftalocianinas con una estructura A_4 [146]. La ciclotetramerización produce una mezcla de

cuatro regioisómeros con un grupo adamantilo en la posición 2 o 3 en cada anillo benceno en la molécula A_4ZnPc .



Esquema 17. Síntesis de la ftalocianinas A_4ZnPc .

Debido a la lipofiliidad del adamantano, la incorporación de una unidad de adamantilo al macrociclo de ftalocianina aumenta la lipofiliidad de la molécula, lo que a su vez puede modificar la capacidad de penetración de estos fotosensibilizadores a las células. Por otra parte, en las estructuras $AZnPc$ y A_4ZnPc , el centro adamantilo se aísla del macrociclo por una cadena alifática de dos carbonos. Este espaciador proporciona una mayor movilidad del resto adamantilo, lo que podría facilitar la interacción de las moléculas con las membranas biológicas.

La síntesis del derivado de ftalocianinas M_4ZnPc fue previamente realizada como se describe en la bibliografía [65].

4.1.2 Estudios espectroscópicos

Los espectros de absorción de las ftalocianinas $AZnPc$, A_4ZnPc y M_4ZnPc fueron realizados en DMF (Figura 19). Los gráficos muestran las bandas Q , una más pequeña a ~ 600 nm y otra intensa a ~ 670 nm, características de las zinc(II) ftalocianinas [147]. Los valores del coeficiente de extinción molar (ϵ) y λ_{max} de absorción se muestran en la Tabla 1. La banda Q de absorción aguda de la ftalocianina $AZnPc$ indica que este fotosensibilizador se encuentra principalmente en forma monomérica en DMF. Por otra parte, los espectros de absorción de M_4ZnPc y A_4ZnPc presentan un leve ensanchamiento en la zona de la banda Q . Este

comportamiento podría indicar que los fotosensibilizadores se encuentran parcialmente agregados. Por otro lado, las bandas Q de A_4ZnPc y M_4ZnPc presentan un corrimiento batocrómico de ~ 10 nm respecto de la $AZnPc$ en DMF (Figura 19). Este efecto es producido por la presencia de un número mayor de grupos auxocromos en la periferia del macrociclo en A_4ZnPc y M_4ZnPc .

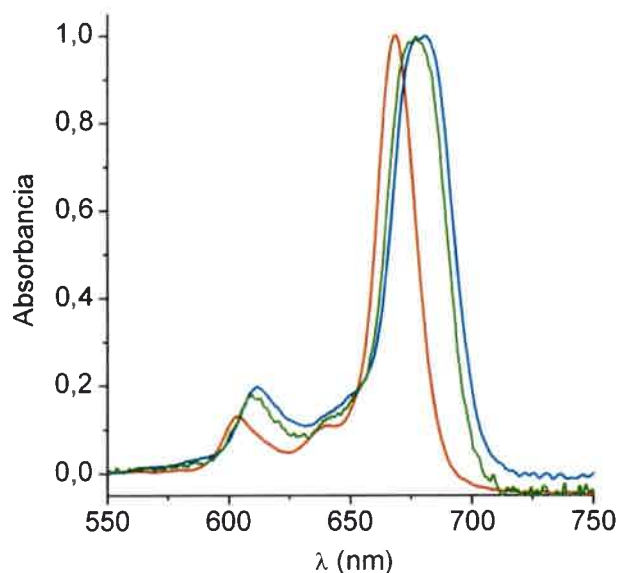


Figura 19. Espectros de absorción de las ftalocianinas $AZnPc$ (rojo), A_4ZnPc (azul) y M_4ZnPc (verde) en DMF.

Los espectros de emisión de fluorescencia muestran una banda intensa centrada en ~ 672 nm para $AZnPc$, en ~ 688 nm para A_4ZnPc y en ~ 678 nm M_4ZnPc (Figura 20). Los valores de Φ_F en DMF fueron determinados por comparación con la referencia ($ZnPc$). Estos valores de Φ_F se muestran en la Tabla 1. Los resultados concuerdan con aquellos reportados previamente para zinc(II) ftalocianinas similares en medios homogéneos [86].

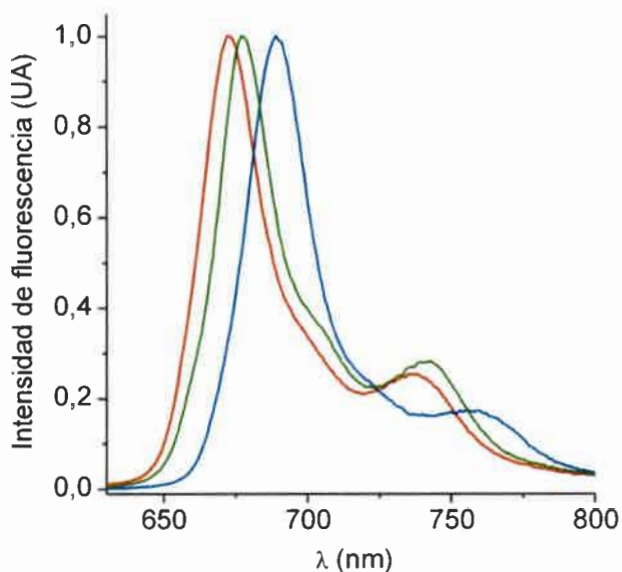


Figura 20. Espectros de emisión de fluorescencia de AZnPc (rojo), A₄ZnPc (azul) y M₄ZnPc (verde) en DMF (λ_{exc} = 610 nm).

Tabla 1. Características espectroscópicas de las ftalocianinas y rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) en DMF.

Ftalocianinas	$\lambda_{max}(Abs)^a$	$\lambda_{max}(Emisión)$	$\epsilon (M^{-1}cm^{-1})$	Φ_F
AZnPc	668	672	$1,96 \times 10^5$	$0,17 \pm 0,01$
A ₄ ZnPc	680	688	$2,08 \times 10^5$	$0,25 \pm 0,01$
M ₄ ZnPc	676	678	$2,01 \times 10^5$	$0,26 \pm 0,01$

^a absorción en la banda Q

La absorción de las ftalocianinas AZnPc y A₄ZnPc fue estudiada en diferentes solventes orgánicos y agua. Los espectros típicos de los derivados de zinc(II) ftalocianinas muestran dos bandas características a diferentes longitudes de onda. La banda que aparece a ~635 nm, corresponde a la especie agregada mientras que la otra banda a ~675 nm es debida al monómero [83,88].

Para AZnPc se observa una solubilidad significativa en DMSO y DMF, mientras que en tolueno, metanol y diclorometano la solubilidad como monómero es relativamente más baja. Por otra parte, la AZnPc se encuentra principalmente agregada en agua (Figura 21).

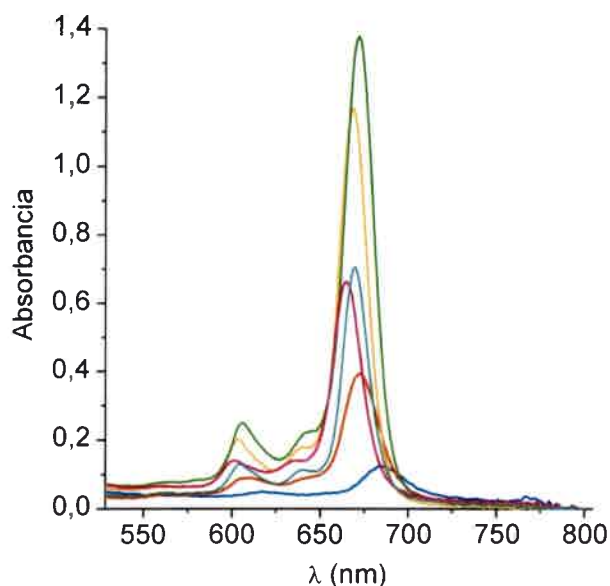


Figura 21. Espectros de absorción de AZnPc en distintos medios. Agua (azul), diclorometano (rojo), DMF (naranja), DMSO (verde), metanol (violeta), tolueno (celeste).

El derivado simétrico A_4ZnPc , presenta una mayor solubilidad en tolueno, diclorometano y DMF, mientras que se encuentra agregado en DMSO, agua y metanol (Figura 22). Estos resultados tienen relación con las estructuras de los macrociclos ya que la ftalocianina tetrasustituída A_4ZnPc posee un mayor carácter lipofílico que AZnPc, monosustituída con una unidad de adamantano.

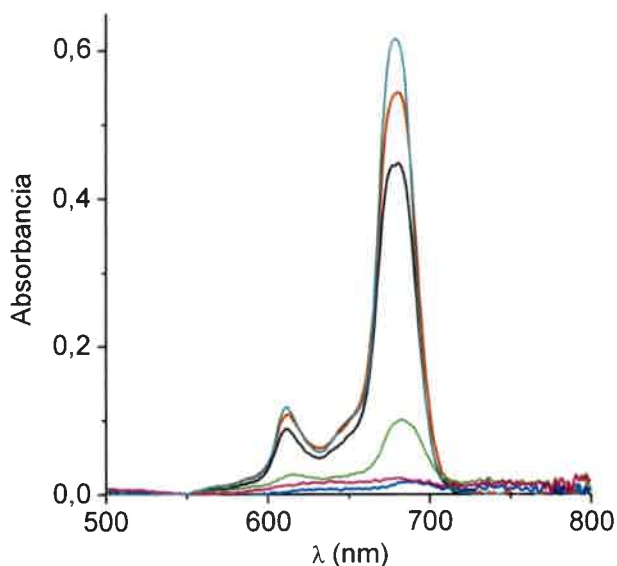
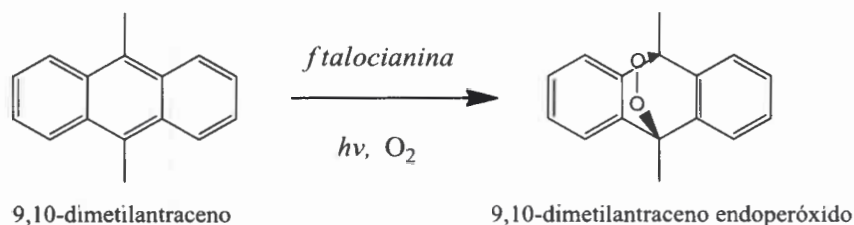


Figura 22. Espectros de absorción de A_4ZnPc en distintos medios. Agua (azul), diclorometano (rojo), DMF (negro), DMSO (verde), metanol (violeta), tolueno (celeste).

4.1.3. Actividad fotodinámica

La producción de $^1\text{O}_2$ por las ftalocianinas fue estudiada por un método indirecto en presencia del sustrato 9,10-dimetilantraceno (DMA). Esta molécula reacciona específicamente con el $^1\text{O}_2$, dando lugar a un endoperóxido en su estructura, formado a expensas de la oxidación de los dobles enlaces en el anillo central (Esquema 18) [47,148]. Por lo tanto, DMA fue usado para evaluar la habilidad de los sensibilizadores para producir $^1\text{O}_2$.

La descomposición del DMA fotosensibilizada por las ftalocianinas fue estudiada en diferentes medios, irradiando la solución en condiciones aeróbicas [47]. En la oscuridad y en presencia de los sensibilizadores, no se observaron cambios en los espectros de absorción del DMA. Sin embargo, cuando la ftalocianina es irradiada con luz monocromática, la fotooxidación puede seguirse espectroscópicamente por la desaparición de las bandas características del DMA a λ_{max} de 378 nm (Figura 23). En estas condiciones experimentales, las ftalocianinas fueron fotoestables durante el proceso de irradiación.



Esquema 18. Reacción del DMA con el oxígeno molecular singlete.

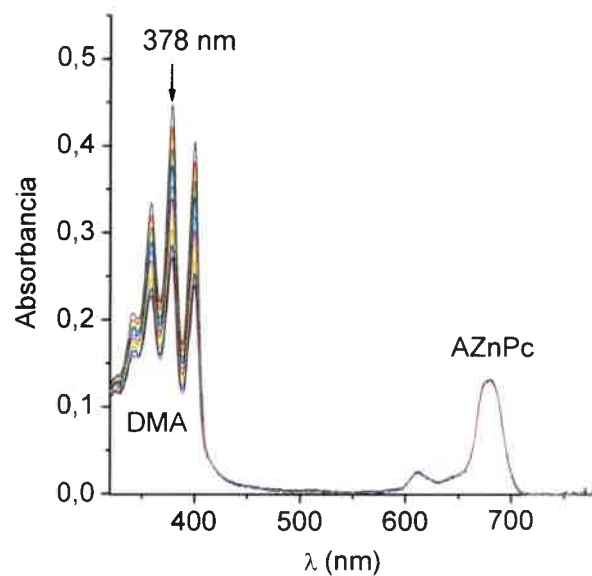


Figura 23. Espectros de absorción a distintos tiempos de irradiación ($\lambda_{\text{max}} = 378 \text{ nm}$) para la fotooxidación de DMA sensibilizada por AZnPc en DMF ($\lambda_{\text{irr}} = 668 \text{ nm}$).

4.1.3.1. Medio homogéneo

En la Figura 24 se muestran las gráficas semilogarítmicas típicas que describen el progreso de la reacción para el DMA fotosensibilizado por las ftalocianinas AZnPc, A₄ZnPc y M₄ZnPc en DMF. A partir de las pendientes de estos gráficos fueron obtenidas las constantes de velocidad observadas (Tabla 2, $k_{\text{obs}}^{\text{DMA}}$), irradiando el sistema en la banda Q. El rendimiento cuántico de producción de ¹O₂ (Φ_{Δ}) fue calculado comparando las pendientes de AZnPc y A₄ZnPc con la correspondiente a la referencia [86]. En DMF las ftalocianinas fotodescomponen DMA a velocidades similares, indicando que estos sensibilizadores presentan una producción de ¹O₂ comparable. Como se puede observar en la Tabla 2, tanto AZnPc y A₄ZnPc como M₄ZnPc presentan una mayor eficiencia en la producción de ¹O₂ en DMF a la encontrada para ZnPc $\Phi_{\Delta}=0,56$ en DMF. [138,147]. No obstante, el microambiente biológico puede inducir cambios en las propiedades fotofísicas del sensibilizador establecidas en solución [149].

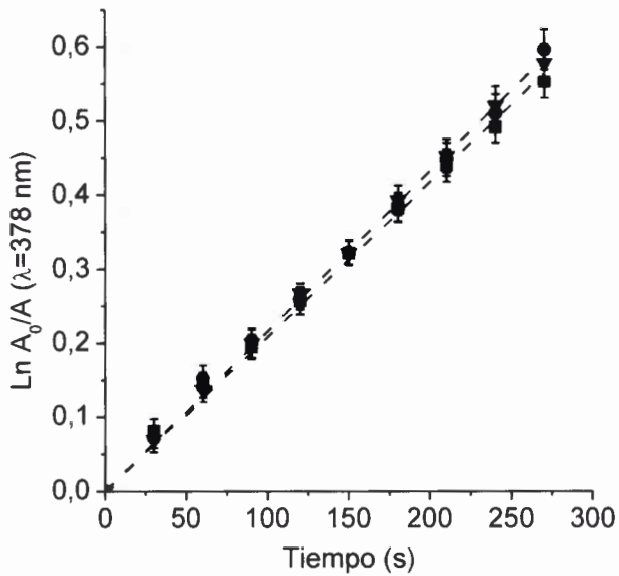


Figura 24. Fotooxidación de DMA (35 μM) sensibilizado por ftalocianinas. Gráfico de primer orden para las ftalocianinas AZnPc (●), A₄ZnPc (▼) y M₄ZnPc ($\lambda_{\text{irr}}=675$ nm) en DMF (■) ($\lambda_{\text{irr}}=668$ nm). Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados.

4.1.3.2. Medio microheterogéneo

La actividad fotodinámica de las ftalocianinas fue estudiada en medio micelar. Las micelas inversas son sistemas dinámicos constituidos por moléculas anfifílicas (surfactantes), cuyos grupos polares se ubican hacia el interior permitiendo la solubilidad en solventes lipofílicos. La solubilización de sustratos en soluciones micelares juega un rol importante tanto en procesos biológicos como industriales [150]. En estos sistemas, el soluto puede localizarse en diferentes microentornos: el solvente orgánico externo, el centro acuoso o la interfase micelar. Los sistemas microheterogéneos constituidos por micelas son frecuentemente utilizados como modelos interesantes para mimetizar el agua que se encuentran en diferentes compartimentos subcelulares. También han sido utilizados como medios biomiméticos simples para evaluar el comportamiento de sustratos de origen biológico, proteínas y enzimas [47,140].

Entre los surfactantes capaces de formar micelas inversas, el AOT es uno de los más usados debido a que las soluciones de AOT en solventes no polares tienen la habilidad de

solubilizar grandes cantidades de agua. Así, compuestos solubles e insolubles en agua se pueden disolver simultáneamente en las micelas inversas debido a la presencia de microentornos de diferente polaridad.

Para evaluar la unión de la ftalocianina AZnPc a las micelas, los espectros de absorción de fueron estudiados variando la concentración de AOT, en micelas inversas de *n*-heptano/AOT/agua ($W_0=10$) (Figura 25).

A medida que aumenta la concentración de AOT fue observado un incremento en la intensidad de la banda *Q*. Este efecto puede ser atribuido a la asociación entre la ftalocianina y la micela. Conociendo los valores de la pendiente y la ordenada al origen del gráfico de la Figura 25 fue calculado el valor de K_{AOT} para la AZnPc, dando un valor de $10000 \pm 300 \text{ M}^{-1}$.

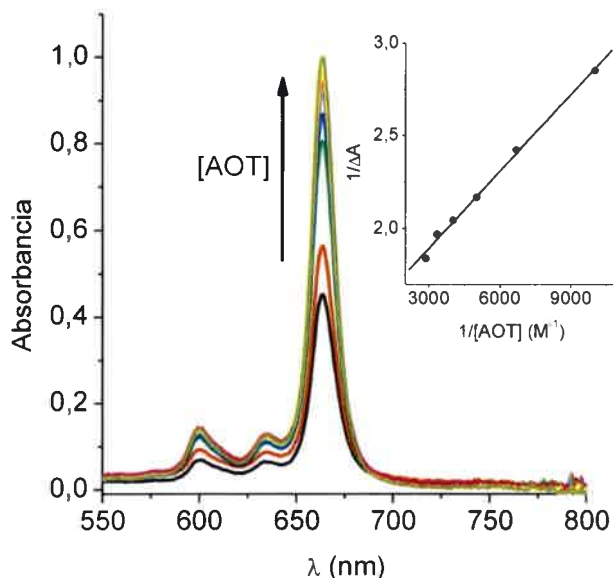


Figura 25. Cambios en la absorción de la banda *Q* para la ftalocianina a distintas concentraciones de AOT (0,2; 0,4; 0,6; 1,0; 1,5; 2,0 mM). Gráfico insertado: variación de $1/(A-A_{Hp})$ en función de $1/[AOT]$ (Ecuación 8) para la AZnPc en micelas inversas de *n*-heptano/AOT/agua ($W_0=10$).

El valor de K_{AOT} indica que la ftalocianina se encuentra principalmente asociada a la interfase micelar. Por otra parte, A_4ZnPc y M_4ZnPc no interaccionan con las micelas de AOT.

La actividad fotodinámica de las ftalocianinas fue analizada en micelas inversas de *n*-heptano/AOT (0,1 M)/agua ($W_0=10$). La descomposición de DMA fue estudiada en las micelas inversas de AOT en condiciones aeróbicas (Figura 26). Debido al carácter no polar

del DMA, puede asumirse que este sustrato está principalmente disuelto en la fase orgánica (*n*-heptano) del sistema micelar [47].

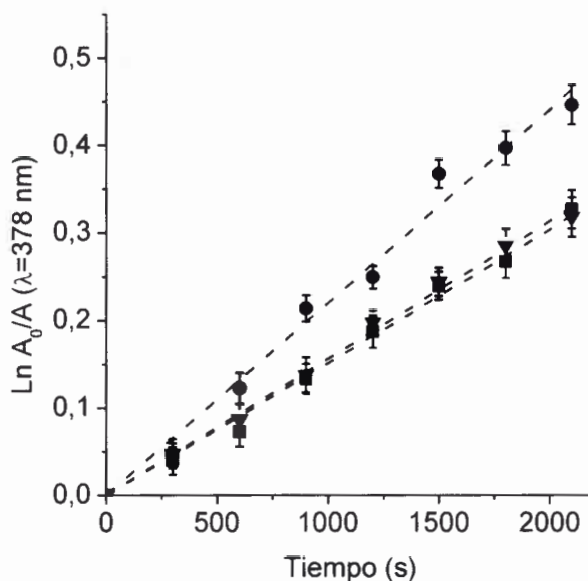


Figura 26. Fotooxidación de DMA (35 μM) sensibilizado por ftalocianinas. Gráfico de primer orden para las ftalocianinas AZnPc (●), A₄ZnPc (▼) ($\lambda_{\text{irr}}=675$ nm) y M₄ZnPc (■) en micelas inversas de *n*-heptano/AOT/agua ($W_0=10$) ($\lambda_{\text{irr}}=$ máximo de la banda Q). Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados.

En la Tabla 2 se muestran los valores de k_{obs} para la fotooxidación de DMA en micelas por parte de las tres ftalocianinas en estudio. Como se puede observar, el valor de k_{obs} para AZnPc resulta mayor que los correspondientes a A₄ZnPc y M₄ZnPc, esto indica que AZnPc fue el mejor fotosensibilizador para descomponer DMA en micelas inversas de AOT.

Los valores de Φ_{Δ} para AZnPc, A₄ZnPc y M₄ZnPc fueron calculados usando ZnPc como referencia (Tabla 2). En el sistema micelar, las ftalocianinas pueden estar ubicadas en diferentes microambientes en función de su estructura. AZnPc fue el fotosensibilizador más eficiente para generar $^1\text{O}_2$ en el sistema micelar, posiblemente debido a que este compuesto se encuentra en forma monomérica en el medio microheterogéneo. El comportamiento observado fue diferente para AZnPc y A₄ZnPc, la asimetría de AZnPc podría promover una mejor ubicación en la interfase micelar. La actividad fotodinámica inducida por A₄ZnPc fue

similar a la encontrada para M₄ZnPc, lo que podría estar relacionado con que estas ftalocianinas sustituidas simétricamente se encuentran en el mismo microambiente micelar.

Tabla 2. Parámetros cinéticos (k_{obs}) para la descomposición de DMA sensibilizada por ftalocianinas y rendimientos cuánticos de ¹O₂ (Φ_{Δ}) en DMF y micelas inversas de *n*-heptano/AOT (0,1 M)/agua ($W_0=10$).

Ftalocianinas	$k_{obs}^{DMF} (s^{-1})^a$	Φ_{Δ}^a	$k_{obs}^{AOT} (s^{-1})^b$	Φ_{Δ}^b
AZnPc	$(2,16 \pm 0,4) \times 10^{-3}$	0,72 \pm 0,05	$(2,20 \pm 0,4) \times 10^{-4}$	0,75 \pm 0,05
A ₄ ZnPc	$(2,16 \pm 0,4) \times 10^{-3}$	0,72 \pm 0,05	$(1,59 \pm 0,3) \times 10^{-4}$	0,55 \pm 0,05
M ₄ ZnPc	$(2,06 \pm 0,3) \times 10^{-3}$	0,69 \pm 0,05	$(1,63 \pm 0,3) \times 10^{-4}$	0,56 \pm 0,05

^a en DMF, ^b en *n*-heptano/AOT (0,1 M)/agua ($W_0 = 10$)

Por otro lado, al comparar los resultados en DMF con los obtenidos en micelas, la velocidad de fotodescomposición de DMA es un orden de magnitud mayor en el medio homogéneo que en las micelas inversas de AOT. Estos resultados podrían atribuirse a un cambio en la velocidad de reacción de DMA con ¹O₂ en solventes alifáticos no polares como *n*-heptano o a la distribución del ¹O₂ entre las diferentes pseudo fases micelares.

En trabajos anteriores fue observado un comportamiento similar en micelas inversas de AOT utilizando porfirinas como sensibilizadores [151]. Resultados reportados previamente muestran que en el sistema micelar AOT, el ¹O₂ se reparte entre las pseudo fases interna y externa con una constante de partición de 0,11 [148].

4.1.4. Estudios en *Candida albicans*

La actividad fotodinámica de AZnPc y A₄ZnPc fue evaluada en suspensiones celulares de *C. albicans* en PBS (1×10^6 UFC/mL). Las células fueron tratadas con 10 μ M de las ftalocianinas por 30 min a 37°C en oscuridad e irradiadas por 30 min con luz visible. Los

experimentos control muestran que la viabilidad de *C. albicans* no fue afectada por la exposición a la luz en ausencia del fotosensibilizador o por incubación en la oscuridad en presencia de las ftalocianinas.

Por otro lado, la viabilidad de *C. albicans* luego de la irradiación de 30 min en presencia de AZnPc y A₄ZnPc no se vió afectada frente a las concentraciones de ftalocianina usadas en el tratamiento, observándose valores de fotoinactivación < 0,5 log. Si bien los valores de Φ_{Δ} observados en la Tabla 2, indican una eficiencia elevada en la producción de ¹O₂, el medio biológico puede influir significativamente en las propiedades de los sensibilizadores, afectando la fotoinactivación de los microorganismos. Estudios previos indican que los fotosensibilizadores sin grupos catiónicos presentes en la periferia del macrociclo son poco efectivos para la inactivación de *C. albicans* en PBS [90].

4.1.5. Ensayos en glóbulos rojos

4.1.5.1. Fotohemólisis de glóbulos rojos por ftalocianinas

La absorción de la hemoglobina a 413 nm es uno de los principales inconvenientes en el estudio de la actividad fotodinámica en glóbulos rojos (Figura 27). Al igual que sus homólogos sintéticos, este derivado de porfirina, formando complejo con hemo, absorbe intensamente entre 400-600 nm. Esta característica prácticamente imposibilita el empleo de muchos compuestos como agentes fotosensibilizadores en glóbulos rojos. Sin embargo, estos sistemas son transparentes a la irradiación roja ($\lambda > 600$ nm). El rango de longitudes de onda que abarca desde los 400 nm hasta los 600 nm es apropiado para fotoexcitar las ftalocianinas, las cuales absorben intensamente entre 650-690 nm.

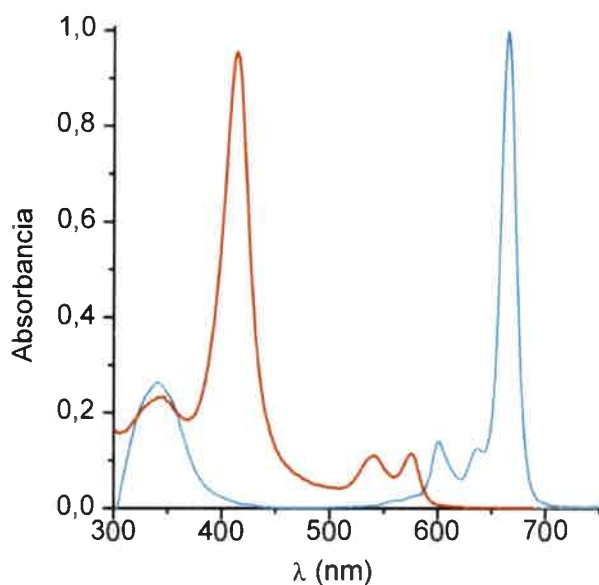


Figura 27. Espectro de absorción de la hemoglobina (rojo) y una ftalocianina (negro).

Las membranas biológicas son blancos importantes para muchos sensibilizadores. En este sentido, los glóbulos rojos de mamíferos constituyen un modelo de sistema atractivo y conveniente para estudiar la fotomodificación de las membranas [142,152-158]. El uso de ftalocianinas en la actividad fotodinámica de las células de eritrocitos ha sido de gran interés por la absorción intensa en la región roja del espectro, donde la hemoglobina tiene una zona de absorción mínima (Figura 28) [159,160]. Además, la hemoglobina liberada por la hemólisis de los glóbulos rojos puede ser fácilmente evaluada por espectroscopía de absorción a una longitud de onda de 413 nm.

Para evaluar la actividad fotodinámica de AZnPc, A₄ZnPc y M₄ZnPc en las membranas celulares *in vitro*, fue utilizada la fotohemólisis de los eritrocitos humanos. La toxicidad celular inducida por los fotosensibilizadores fue analizada primero en la oscuridad. Las suspensiones de glóbulos rojos fueron tratadas con las ftalocianinas (1-10 μM) durante 30 min a temperatura ambiente. Bajo estas condiciones experimentales, los tres sensibilizadores analizados no producen una hemólisis significativa. La iluminación de los eritrocitos sin tratar, a la mayor dosis de luz utilizada, no induce fotohemólisis. Por esto, la hemólisis obtenida después de irradiar a los glóbulos rojos tratados con las ftalocianinas es debida al efecto de fotosensibilización del agente producida por la luz visible. La Figura 28 muestra los resultados espectroscópicos característicos del sobrenadante de suspensiones de glóbulos

rojos obtenido mediante la separación de las células por centrifugación. La suspensión de los eritrocitos en agua destilada produce 100% de hemólisis, mostrando el espectro de la hemoglobina con un máximo de absorbancia a 413 nm en agua. Un resultado similar también se obtuvo para los eritrocitos tratados con 5 μM de AZnPc e irradiados durante 30 min con luz visible. Sin embargo, como se mencionó anteriormente en los controles oscuridad e irradiados en ausencia de la ftalocianina prácticamente no se observa liberación de la hemoglobina a la solución.

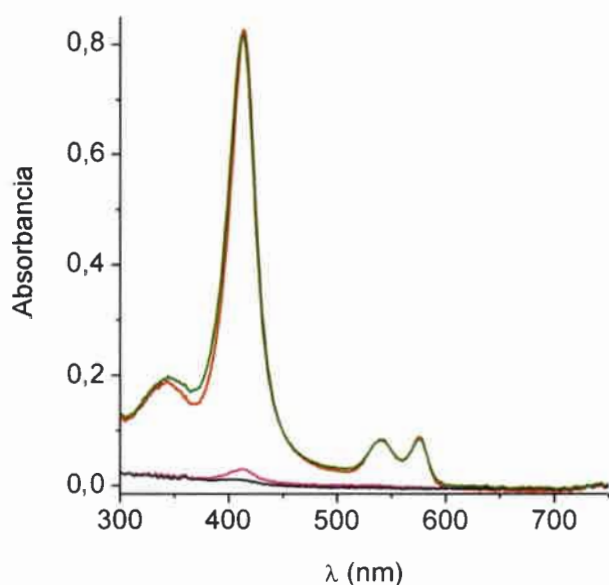


Figura 28. Espectro de absorción característico del sobrenadante de una suspensión de glóbulos rojos después de la separación de las células por centrifugación, eritrocitos en agua destilada ó 100% hemólisis (rojo), eritrocitos tratados con 5 μM AZnPc (5 μM) e irradiados durante 30 min con luz visible (verde), control oscuridad (negro) y control irradiado (magenta). Las células fueron centrifugadas a 3000 rpm por 15 min y 100 μL del sobrenadante fue disuelto en 2 mL de agua destilada.

La hemólisis fue dependiente del agente fotosensibilizador utilizado y del tiempo de exposición de los eritrocitos a la luz visible (Figura 29). Después de 30 min de irradiación, la mayor lisis celular fue producida en las células sensibilizadas con AZnPc, obteniendo un porcentaje del ~98%, mientras que M_4ZnPc produce ~70%. En contraste con estos resultados, solamente un 5% de hemólisis fue obtenido para los eritrocitos tratados con A_4ZnPc . Así el

elevado porcentaje de daño encontrado para AZnPc puede estar relacionado a la alta actividad fotodinámica observada en el medio micelar que, a su vez, posiblemente se deba a la localización en un microentorno celular que facilita su solubilización en forma monomérica. Este también parece ser el caso para M₄ZnPc, aunque el fotodaño es menor que el producido por AZnPc. Por otro lado, la baja hemólisis sensibilizada por A₄ZnPc, posiblemente se debe a una extensa agregación en la suspensión de glóbulos rojos. Estos resultados indican que aunque las tres ftalocianinas presentan un rendimiento de ¹O₂ similar en medio homogéneo, la actividad fotodinámica en el medio biológico puede cambiar significativamente y depende principalmente de la capacidad de incorporación del sensibilizador al medio celular y de su solubilización como monómeros.

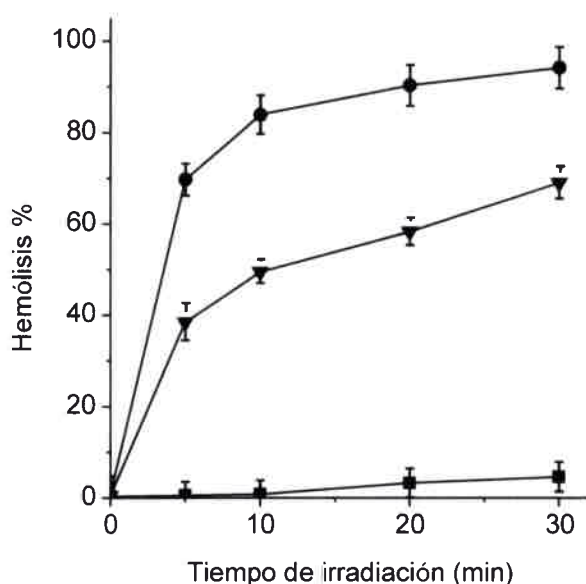


Figura 29. Porcentaje de hemólisis producida en glóbulos rojos tratados durante 30 min con con 5 μ M de AZnPc (●) A₄ZnPc (■) y M₄ZnPc (▼) en la oscuridad e irradiados con luz visible por distintos tiempos. Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

Debido a que AZnPc mostró ser el fotosensibilizador más efectivo, se evaluó la capacidad fotohemolítica de esta ftalocianina utilizando diferentes concentraciones (Figura 30). Como puede observarse, la hemólisis de los glóbulos rojos aumenta con la concentración

de AZnPc al pasar de 1 a 5 μM . Para obtener un 50% de hemólisis, las células tratadas con 5 μM de AZnPc requieren una irradiación de ~ 3 min, mientras que para las incubadas con 1 μM este valor no se alcanza aún después de 30 min. Por otro lado, un incremento en la concentración de 5 a 10 μM de AZnPc no afecta significativamente la fotohemólisis. En estas condiciones, es posible que la concentración intracelular de fotosensibilizador se encuentre saturada y un aumento en la cantidad de la ftalocianina en la solución no produce una mayor actividad fotodinámica. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, los ensayos realizados posteriormente en glóbulos rojos fueron llevados a cabo únicamente empleando 5 μM de la ftalocianina AZnPc.

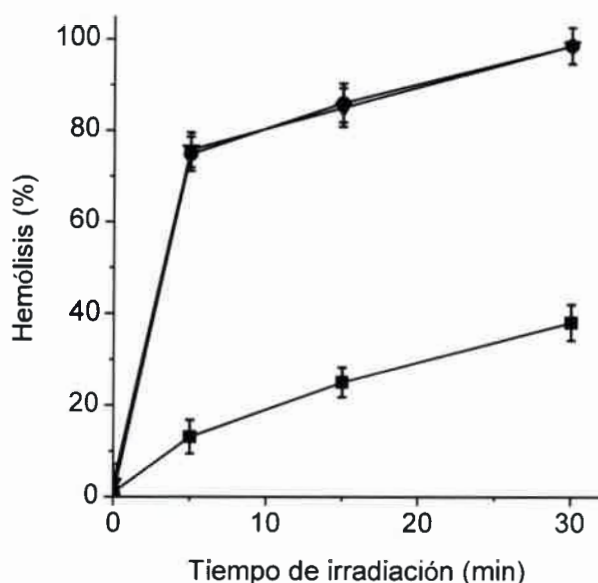


Figura 30. Porcentaje de hemólisis producida en glóbulos rojos tratados durante 30 min con distintas concentraciones de AZnPc 1 μM (■), 5 μM (▼) y 10 μM (●) y en la oscuridad e irradiados con luz visible a distintos tiempos. Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

4.1.5.2. Resistencia osmótica de glóbulos rojos tratados con ftalocianinas

La toxicidad biológica de las especies reactivas del oxígeno sobre los glóbulos rojos humanos puede ser evidenciada por medio de la fragilidad osmótica. El daño fotodinámico de

los eritrocitos produce un incremento significativo de la fluidez de la membrana debido a que se producen defectos en la misma [12]. Este efecto disminuye la estabilidad osmótica de los eritrocitos, con la consecuente liberación de la hemoglobina. La Figura 31 muestra las curvas de fragilidad osmótica de las células tratadas con 5 μM del fotosensibilizador e irradiadas por 3 min con luz visible. Los resultados indican que la irradiación de los glóbulos rojos en presencia de la ftalocianina produce un aumento en la fragilidad osmótica de las células. El efecto es mayor para los eritrocitos tratados con AZnPc con respecto a M₄ZnPc. Así, la concentración de NaCl correspondiente al 50 % de hemólisis de los eritrocitos nativos en la oscuridad es del 0,43 %, mientras que para las células tratadas con AZnPc y M₄ZnPc los valores fueron de 0,68 y 0,65 %, respectivamente. Un comportamiento similar fue previamente informado para otros agentes fotosensibilizadores derivados de ftalocianinas [83,158]. Por lo tanto, AZnPc y M₄ZnPc inducen un fotodaño en la membrana, el cual se manifiesta por una disminución en la resistencia osmótica.

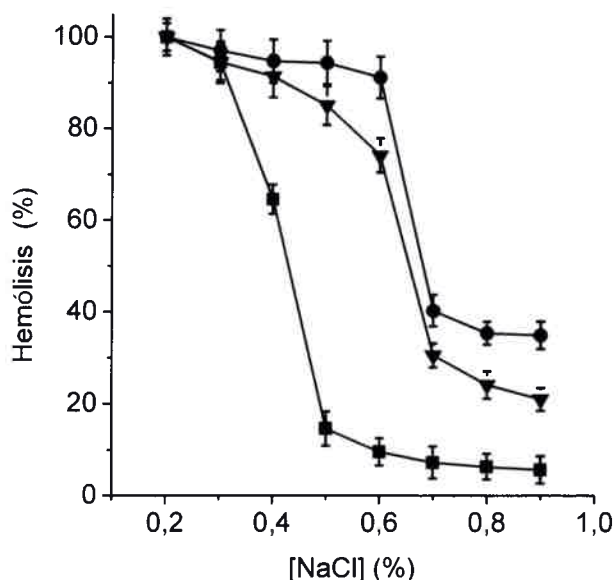


Figura 31. Fragilidad osmótica de los glóbulos rojos incubados con 5 μM de AZnPc (●) y M₄ZnPc (▼) por 30 min en la oscuridad e irradiados por 3 min con luz visible. Después de la irradiación, las células fueron inmediatamente lavadas e incubadas por 30 min en diferentes soluciones de NaCl. Control con el fotosensibilizador en la oscuridad (■). Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

La morfología de los eritrocitos fue observada por microscopía después de una incubación con 5 μM de AZnPc y un tiempo de irradiación de 3 min. Las observaciones microscópicas demuestran que las células cambiaron su forma discoidal bicóncava normal después de tratamiento fotodinámico. Las células perdieron su perfil normal y presentan una configuración espinosa con ampollas en sus superficies (Figura 32). Este efecto tuvo lugar en todas las muestras estudiadas con fotohemólisis parcial. Estos resultados proporcionan evidencia sobre la deformación de la membrana y un incremento en el volumen de las células que indican una mayor fragilidad después de la acción fotodinámica. Una deformación similar de la membrana se ha encontrado previamente por daño oxidativo de los eritrocitos humanos [161]. En conclusión, el efecto fotodinámico lesiona los glóbulos rojos produciendo un aumento significativo de la fluidez de la membrana favoreciendo la aparición de defectos en la misma, de esta forma disminuye la estabilidad osmótica de los eritrocitos y se libera la hemoglobina.

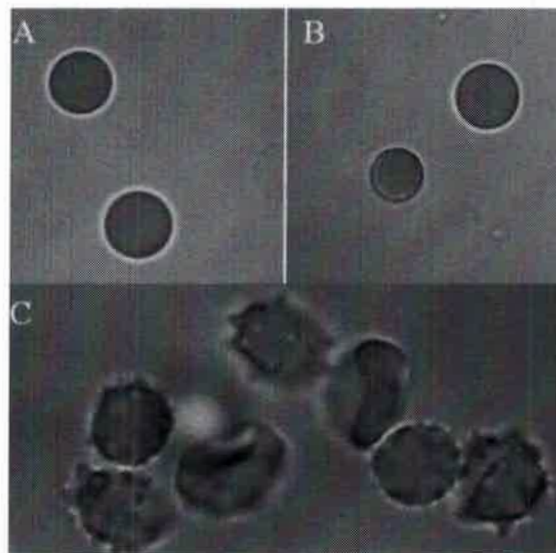
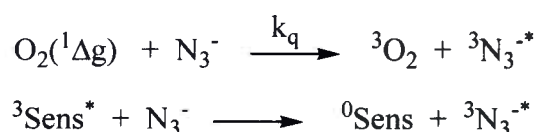


Figura 32. Fotografía que muestra la morfología de los eritrocitos (A) de control no tratados con fotosensibilizador e irradiados durante 3 min; (B) Control tratados con 5 μM AZnPc en la oscuridad y (C) tratados con 5 μM AZnPc e irradiados durante 3 min con luz visible ($300 \text{ W} / \text{m}^2$); objetivo de 100x.

4.1.5.3. Mecanismos de fotohemólisis de glóbulos rojos por ftalocianinas

Un aspecto interesante en estos sistemas es analizar el mecanismo de acción fotodinámica que conduce a la hemólisis de los eritrocitos. Por tal motivo, el fotodaño celular producido por la fotosensibilización por AZnPc y M₄ZnPc fue estudiado en presencia del ion azida y de D-manitol. La presencia de estos compuestos permite evaluar el aporte de los procesos tipo I y tipo II en la acción fotodinámica ejercida por estas ftalocianinas.

En primer lugar, fue estudiado el efecto fotodinámico sobre los glóbulos rojos en presencia del ion azida. Se ha demostrado que la azida puede desactivar tanto el estado ³Sens* como el ¹O₂ a través de la transferencia de energía [1]. El Esquema 19 muestra la desactivación del fotosensibilizador excitado y del ¹O₂ por el ion azida. Este inhibidor es soluble en agua y desactiva el ¹O₂ por *quenching* físico, con una constante de velocidad de *quenching* $k_q = 5 \times 10^8 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ [162].



Esquema 19. Desactivación del sensibilizador excitado y ¹O₂ por azida.

La hemólisis de glóbulos rojos por parte de AZnPc fue analizada en presencia de azida. Para las suspensiones tratadas con 5 μM de AZnPc e irradiadas por 5 min, una concentración de 50 mM de azida provoca una reducción en la hemólisis de 78 a 50 % (Figura 33). En condiciones similares, fue estudiado el efecto de la azida para M₄ZnPc y luego comparado con el obtenido para AZnPc.

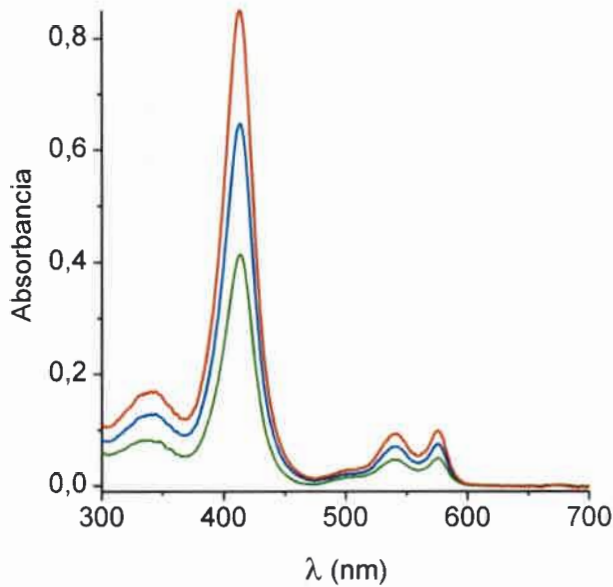
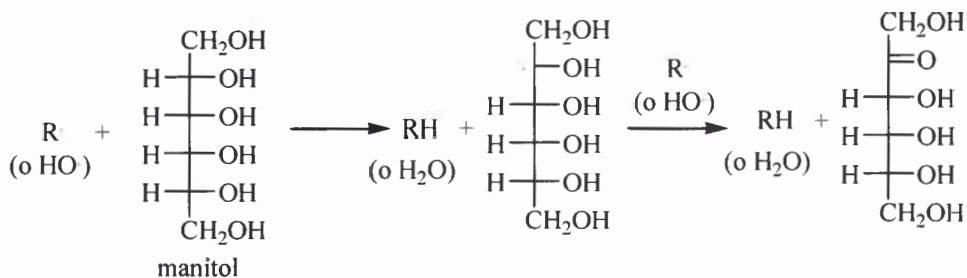


Figura 33. Espectro de absorción del sobrenadante de una suspensión de glóbulos rojos tratados con 5 μM AZnPc e irradiados por 5 min, en ausencia de azida (azul), en presencia de 50 mM de azida (verde) y 100% de hemólisis (rojo). Las células fueron centrifugadas a 3000 rpm por 5 min y 100 μl del sobrenadante fue disuelto en 2 mL de agua destilada.

Por otra parte, este efecto también fue estudiado en presencia de D-manitol, agente utilizado para interrumpir la propagación de especies radicalarias generadas durante el proceso tipo I (Esquema 20) [163-166].



Esquema 20. Desactivación de radicales libres por manitol.

En la Figura 34 se muestran los resultados obtenidos para la hemólisis causada por 5 μM de AZnPc en presencia de 50 mM de D-manitol e irradiado por 5 min con luz visible.

Como puede observarse, la fotohemólisis prácticamente no cambia por la presencia de D-manitol. De manera similar fue estudiado el efecto de D-manitol para M_4ZnPc y posteriormente fue comparado con los resultados obtenidos para $AZnPc$.

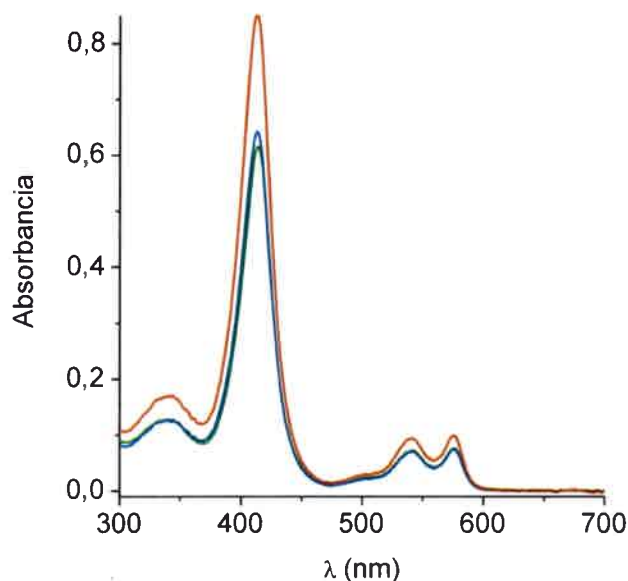


Figura 34. Espectro de absorción del sobrenadante de una suspensión de glóbulos rojos tratados con $5 \mu M$ $AZnPc$ e irradiados por 5 min, en ausencia de D-manitol (azul) y en presencia de 50 mM de D-manitol (verde) y 100% de hemólisis (rojo). Las células fueron centrifugadas a 3000 rpm por 5 min y 100 μL del sobrenadante fue disuelto en 2 mL de agua destilada.

Los resultados para ambas ftalocianinas, $AZnPc$ y M_4ZnPc , son comparados en la Figura 35. Como puede observarse, la presencia de azida está acompañada por una disminución en la ruptura de la membrana de los eritrocitos. Este efecto es aún más marcado para M_4ZnPc debido a que produce un menor fotodaño celular.

En la oscuridad y bajo irradiación sin ftalocianina, la fotohemólisis de las células no se vió afectada por una concentración de 50 mM del ion azida. En presencia de $5 \mu M$ de las ftalocianinas y luz, la adición de ion azida produjo una reducción en la fotohemólisis de los glóbulos rojos (Figura 35). Después de 5 min de irradiación, el porcentaje de hemólisis de los eritrocitos se redujo de 75% a 50% para $AZnPc$, mientras que para M_4ZnPc la hemólisis se redujo de 38% a 12%. Por lo tanto, el ion azida desactiva las especies fototóxicas produciendo un efecto protector sobre las células.

En contraste, la presencia de D-manitol no produce efectos significativos en la hemólisis fotosensibilizada por ambas ftalocianinas. La adición de manitol 50 mM no resultó tóxica para las células en la oscuridad. Además, no fue encontrado efecto hemolítico sobre células irradiadas en presencia de inhibidor. El porcentaje de fotohemólisis empleando 5 μM de ftalocianina, fue similar en presencia o ausencia de manitol para ambos sensibilizadores después de 5 min de irradiación (Figura 35). Un ligero efecto fotoprotector fue observado utilizando M_4ZnPc .

Se ha propuesto anteriormente que el daño a la membrana celular de los eritrocitos ejercida por el tratamiento fotodinámico es debido a la formación de especies reactivas del oxígeno. Además, se ha demostrado que esta actividad fotodinámica puede ser prevenida por antioxidantes [167]. Los presentes resultados indican que la eficacia fotohemolítica no se vió afectada significativamente cuando se añadió manitol a las células sensibilizados por ftalocianinas. En contraste, la presencia de ion azida produce fotoprotección sobre los glóbulos rojos por desactivación del $^1\text{O}_2$. Esto sugiere que el $^1\text{O}_2$ es la principal ROS que participa en la fotohemólisis de los glóbulos rojos causando el daño celular.

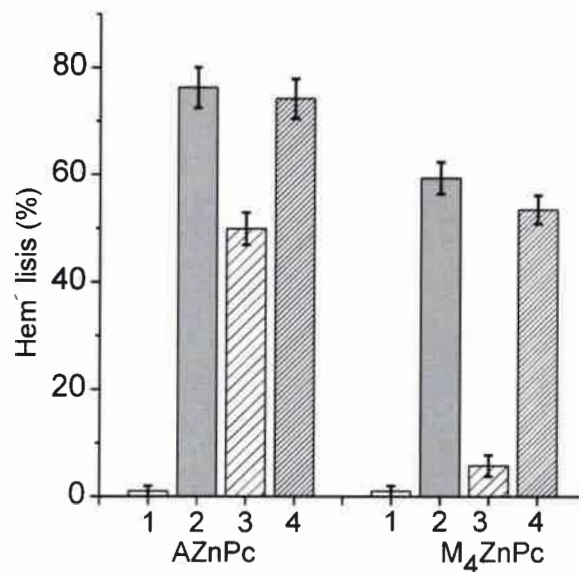


Figura 35. Porcentaje de hemólisis producida en glóbulos rojos tratados con 5 μM de AZnPc y M_4ZnPc : columna 1) control oscuridad; columna 2) irradiados con luz visible durante 5 min; columna 3) en presencia de 50 mM de azida e irradiados con luz visible durante 5 min; columna 4) en presencia de 50 mM de D-manitol e irradiados con luz visible durante 5 min. Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

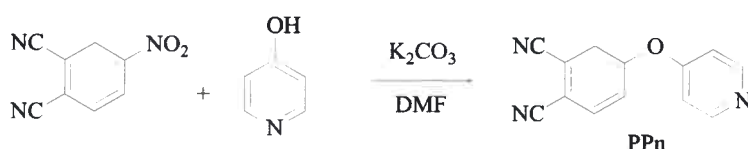
4.2. Estudios de PZnPc y PZnPc⁺ y P₄ZnPc⁴⁺

4.2.1. Síntesis de ftalocianinas

Las cargas positivas permiten una mejor interacción del fotosensibilizador con la envoltura celular de *C. albicans*, por este motivo fueron diseñados y sintetizados nuevos agentes catiónicos. La incorporación de una unidad de piridina permite generar un centro catiónico aislado del macrociclo por una función éter. Esta estructura provee una mayor movilidad a la carga, lo que podría facilitar las interacciones con la pared de las levaduras. Las cargas positivas aisladas del anillo tienen mínima influencia sobre las propiedades fotofísicas de los sensibilizadores.

Dos nuevas ftalocianinas sustituidas por grupos piridina fueron sintetizadas a partir de un derivado de ftalonitrilo. Así, por un lado, la ftalocianina PZnPc⁺ monocatiónica sustituida con una unidad de piridina fue obtenida a partir de la reacción de expansión de una subftalocianina. Por otro lado, mediante la reacción de ciclotetramerización se obtuvo la ftalocianina P₄ZnPc⁴⁺ tetracatiónica, sustituida con cuatro unidades de piridina.

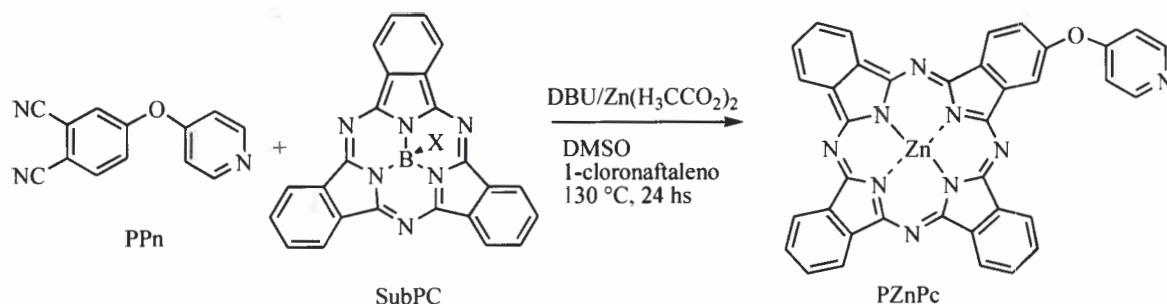
La síntesis de la ftalocianina PZnPc, sustituida por una unidad de piridina, fue realizada utilizando un procedimiento de dos etapas. Primero, el derivado 4-(4-piridiloxi)ftalonitrilo (PPn) fue preparado mediante la reacción de sustitución nucleofílica aromática (S_NAr) *ipso*-nitro entre 4-nitroftalonitrilo y 4-hidroxipiridina (Esquema 21). La reacción tiene lugar en presencia de K₂CO₃ a temperatura ambiente. El medio básico fue usado para activar las propiedades nucleofílicas de la 4-hidroxipiridina. El derivado dinitrilo PPn fue aislado por cromatografía en columna *flash* con un rendimiento de 36%.



Esquema 21. Síntesis del ftalonitrilo PPn.

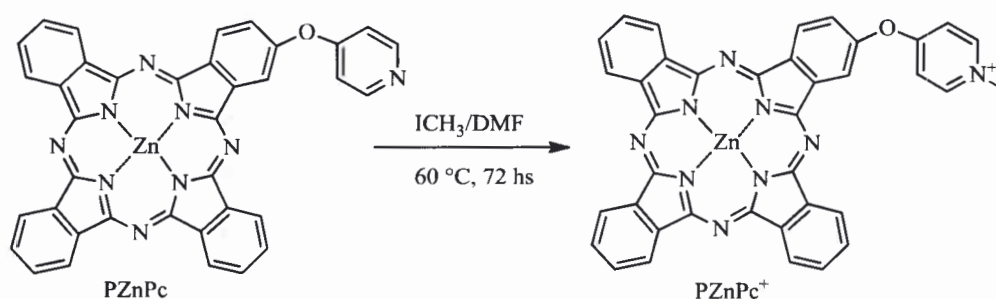
Posteriormente, el ftalonitrilo PPn fue utilizado para expandir el anillo de la SubPc. Con este propósito, la mezcla de reacción fue calentada a 130 °C durante 24 h, en presencia

de DBU como catalizador y de acetato de zinc, para producir la ftalocianina PZnPc con un rendimiento del 23% (Esquema 22).



Esquema 22. Síntesis de la ftalocianina PZnPc.

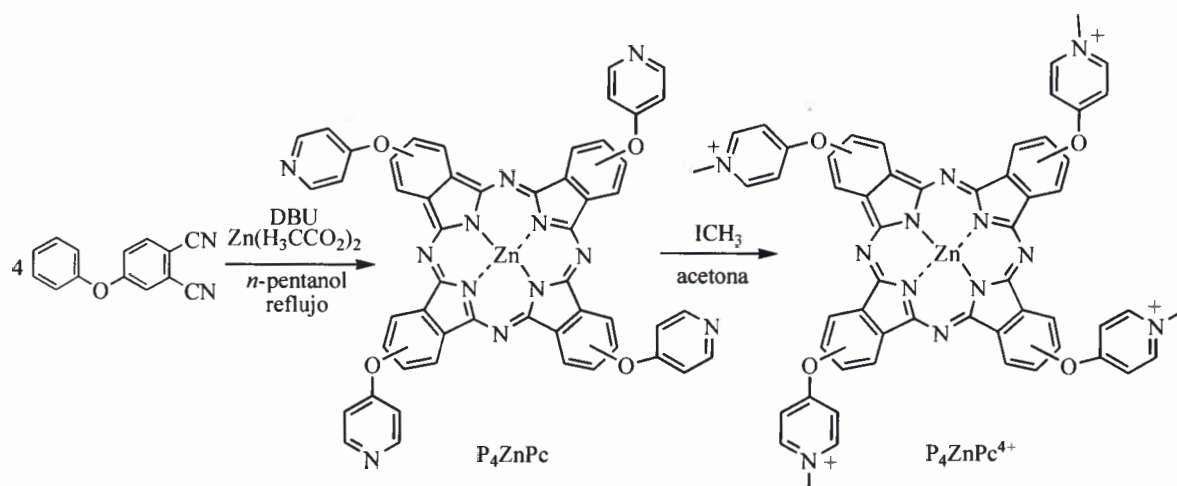
Posteriormente, PZnPc fue tratada con un exceso de yoduro de metilo a reflujo durante 72 h a 60 °C. Este procedimiento permite obtener la ftalocianina monocatiónica PZnPc⁺ con un rendimiento del 94% (Esquema 23).



Esquema 23. Síntesis de la ftalocianina PZnPc⁺.

Por otra parte, para la obtención de una ftalocianina con estructura A₄, el método de síntesis consta de la obtención del ftalonitrilo PPN y la posterior ciclótetramerización. Como producto se obtiene una única ftalocianina. Así, la ftalocianina P₄ZnPc⁴⁺, con simetría A₄, fue obtenida a partir de un procedimiento establecido previamente [86]. En primer lugar, la reacción de ciclótetramerización de PPN con acetato de zinc en presencia de la base orgánica DBU fue realizada en *n*-pentanol. Este procedimiento permite obtener la ftalocianina

tetrasustituída P_4ZnPc . Luego P_4ZnPc fue tratada con un exceso de yoduro de metilo para obtener su análoga tetracatiónica P_4ZnPc^{4+} (Esquema 24).



Esquema 24. Síntesis de la ftalocianina P_4ZnPc^{4+} .

4.2.2. Estudios espectroscópicos

La absorción de las ftalocianinas $PZnPc$ y $PZnPc^+$ y P_4ZnPc^{4+} fue estudiada en DMF. Los espectros de absorción presentan una banda intensa centrada en ~ 669 nm, para $PZnPc$ y $PZnPc^+$, y en ~ 680 nm para P_4ZnPc^{4+} (Figura 36). Los valores del coeficiente de extinción molar (ϵ) y λ_{max} de absorción están resumidos en la Tabla 3. Las banda Q de absorción agudas de las ftalocianinas indican que estos fotosensibilizadores se encuentran principalmente en forma monomérica. La banda Q de P_4ZnPc^{4+} presenta un corrimiento batocrómico de ~ 10 nm respecto de las ftalocianinas monosustituídas en DMF (Figura 36). Este efecto es producido por la presencia de un mayor número de grupos auxocromos de la función éter en la periferia del macrociclo de P_4ZnPc^{4+} .

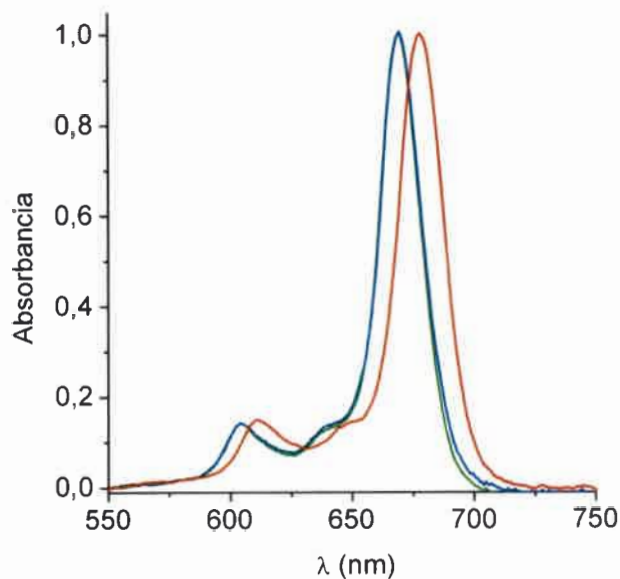


Figura 36. Espectros de absorción de las ftalocianinas PZnPc (verde), PZnPc⁺ (azul) y P₄ZnPc⁴⁺ (rojo) en DMF.

Los espectros de emisión de fluorescencia presentan una banda centrada en ~679 nm, para PZnPc, ~683 nm para PZnPc⁺, y en ~688 nm para P₄ZnPc⁴⁺ (Figura 37).

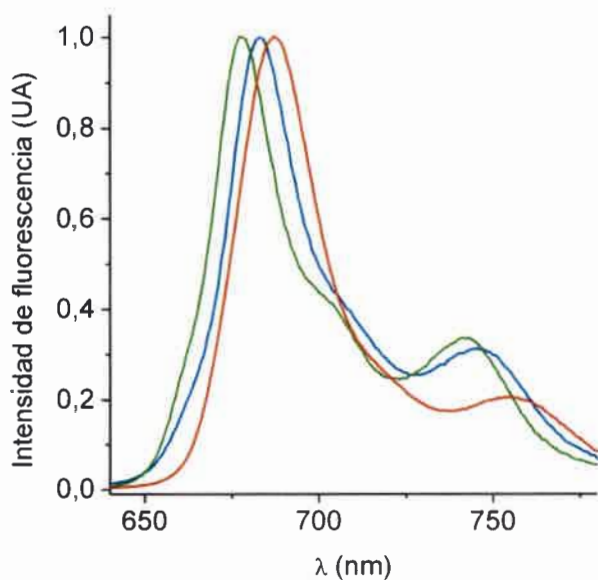


Figura 37. Espectros de emisión de fluorescencia de PZnPc (verde), PZnPc⁺ (azul) y P₄ZnPc⁴⁺ (rojo) en DMF (λ_{exc} = 610 nm).

Los valores de rendimiento de fluorescencia (Φ_F) en DMF fueron obtenidos por comparación con M_4ZnPc . Estos valores de Φ_F se muestran en la Tabla 3. Los resultados concuerdan con aquellos reportados previamente para zinc(II) ftalocianinas similares en medios homogéneos [86]. Además, la emisión de fluorescencia presenta valores de Φ_F apropiados para la detección y cuantificación del sensibilizador en medio biológico.

Tabla 3. Características espectroscópicas de las ftalocianinas y rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) en DMF.

Ftalocianinas	$\lambda_{\max}(\text{Abs})^a$	$\lambda_{\max}(\text{Emisión})$	$\epsilon (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$	Φ_F
PZnPc	669	679	$2,15 \times 10^5$	$0,32 \pm 0,01$
PZnPc ⁺	669	683	$1,95 \times 10^5$	$0,32 \pm 0,01$
P ₄ ZnPc ⁴⁺	678	688	$1,10 \times 10^5$	$0,22 \pm 0,01$
M ₄ ZnPc	676	678	$2,01 \times 10^5$	$0,26 \pm 0,01$

^a absorción en la banda Q

4.2.3. Actividad fotodinámica

La producción de 1O_2 por las ftalocianinas catiónicas fue estudiada en presencia de DMA. La descomposición de DMA fotosensibilizada por las ftalocianinas fue estudiada en DMF y en micelas inversas de AOT, irradiando la solución con luz monocromática en el máximo de absorción de la banda Q en condiciones aeróbicas.

No se observaron cambios en los espectros de absorción del DMA en presencia de los agentes sensibilizadores y sin irradiación. Sin embargo, cuando las ftalocianinas fueron expuestas a la luz, la desaparición de las bandas características del DMA a 378 nm por la fotooxidación fue seguida espectroscópicamente (Figura 38). En todos los casos no se observaron cambios en los espectros de absorción de los fotosensibilizadores, indicando que las ftalocianinas son estables en estas condiciones.

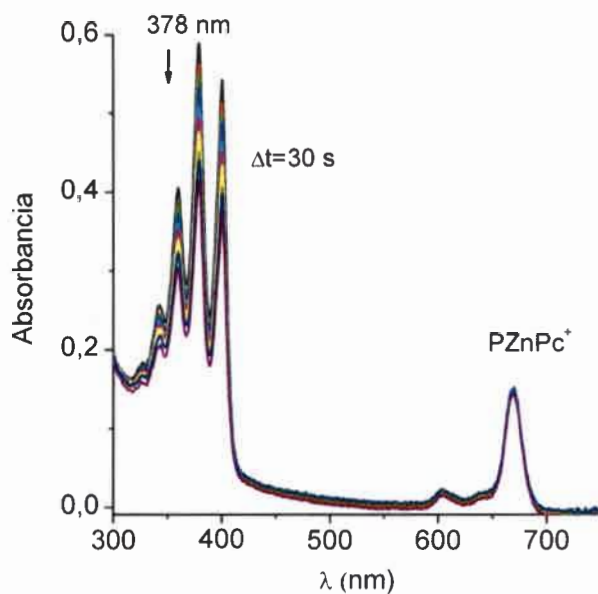


Figura 38. Espectros de absorción a distintos tiempos de irradiación para la fotooxidación de DMA sensibilizada por PZnPc⁺ en DMF ($\lambda_{\text{irr}} = 668\text{nm}$).

4.2.3.1. Medio homogéneo

En la Figura 39 se muestran las gráficas semilogarítmicas típicas que describen el progreso de la reacción para DMA fotosensibilizada por ftalocianinas en DMF. A partir de las pendientes de estos gráficos fueron obtenidas las constantes de velocidad observadas ($k_{\text{obs}}^{\text{DMA}}$, Tabla 4), irradiando el sistema en la banda Q.

Los valores de Φ_{Δ} fueron calculados comparando las pendientes de PZnPc y PZnPc⁺ con la correspondiente a la referencia M₄ZnPc. En DMF las ftalocianinas fotodescomponen DMA a velocidades similares, indicando que estos sensibilizadores presentan una producción comparable de ¹O₂. Como se puede observar en la Tabla 4, PZnPc, PZnPc⁺ y M₄ZnPc presentan una mayor eficiencia en la producción de ¹O₂ en DMF a la encontrada para ZnPc $\Phi_{\Delta}=0,56$ en el mismo solvente. [138,147]. Por otra parte, P₄ZnPc⁴⁺ presenta un valor de rendimiento cuántico de oxígeno singlete de 0,59 [86]. Sin embargo, las propiedades fotodinámicas de los fotosensibilizadores determinadas en solución pueden variar en un microambiente biológico [168].

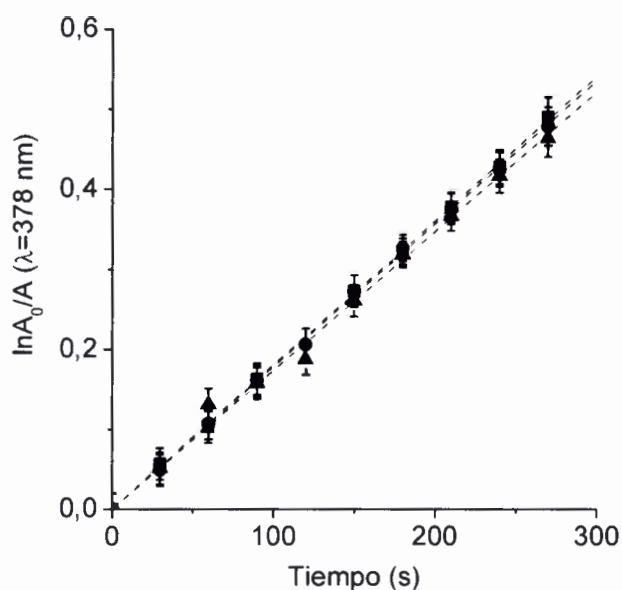


Figura 39. Fotooxidación de DMA (35 μM) sensibilizado por ftalocianinas en DMF. Gráfico de primer orden para las ftalocianinas PZnPc (●), PZnPc⁺ (▲) y M₄ZnPc (■) ($\lambda_{\text{irr}}=675$ nm, $\lambda_{\text{irr}}=668$ nm). Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados.

4.2.3.2. Medio microheterogéneo

La actividad fotodinámica de ftalocianinas fue analizada en micelas inversas de *n*-heptano/AOT (0,1 M)/agua ($W_0=10$). La descomposición de DMA fue estudiada en las micelas inversas de AOT en condiciones aeróbicas (Figura 40). En este microentorno, el sustrato reacciona con el $^1\text{O}_2$ producido por fotosensibilización con la ftalocianina. En la Tabla 4 se muestran los valores de k_{obs} para la fotooxidación de DMA en micelas por parte de las ftalocianinas en estudio. Los cuatro fotosensibilizadores mantienen una actividad fotodinámica similar y acorde a la producción de $^1\text{O}_2$ encontrada en medio homogéneo. Los resultados indican que la velocidad de fotodescomposición de DMA es un orden de magnitud mayor en medio homogéneo con respecto al sistema micelar. Este comportamiento puede ser debido a un cambio en la velocidad de reacción del DMA en *n*-heptano con respecto a la DMF y a la distribución del $^1\text{O}_2$ en la interface micelar [169].

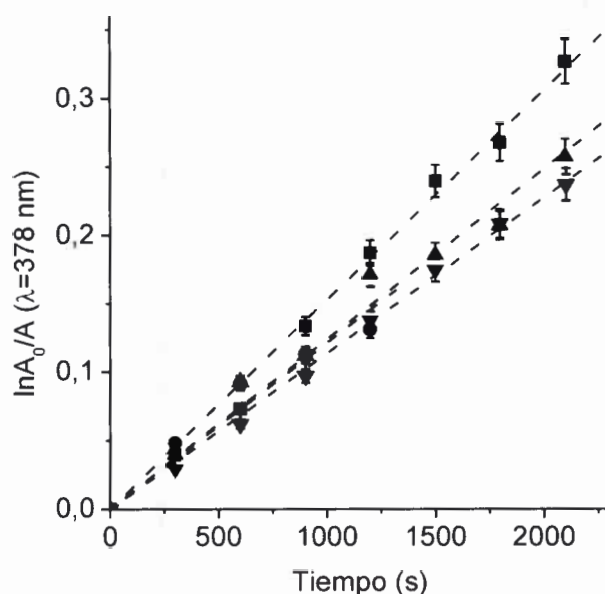


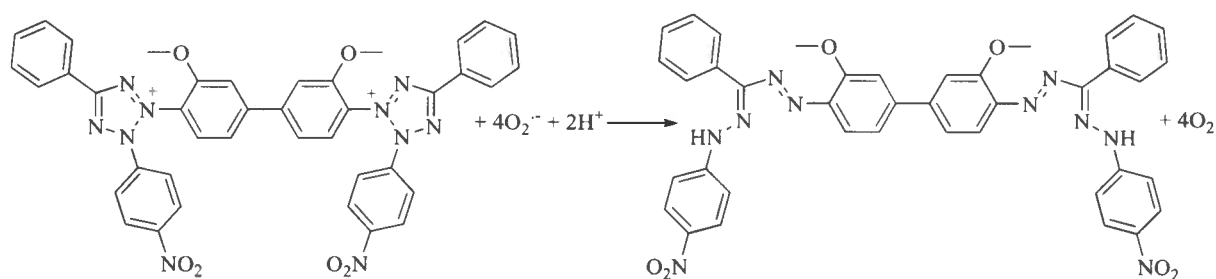
Figura 40. Fotooxidación de DMA (35 μM) sensibilizado por ftalocianinas. Gráfico de primer orden para las ftalocianinas PZnPc (●), PZnPc⁺ (▼), P₄ZnPc⁴⁺ (▲) y M₄ZnPc (■) en micelas inversas de *n*-heptano/AOT (0,1 M)/agua ($W_0=10$) (λ_{irr} = máximo de la banda Q). Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados.

Tabla 4. Parámetros cinéticos (k_{obs}) para la descomposición de DMA sensibilizada por ftalocianinas en DMF, en micelas inversas de *n*-heptano/AOT (0,1 M)/agua ($W_0= 10$) y rendimientos cuánticos de producción de ¹O₂ (Φ_{Δ}).

Ftalocianinas	$k_{\text{obs}}^{\text{DMF}}$ (s ⁻¹)	Φ_{Δ}	$k_{\text{obs}}^{\text{AOT}}$ (s ⁻¹)
PZnPc	$(1,79 \pm 0,04) \times 10^{-3}$	0,68 \pm 0,05	$(1,21 \pm 0,04) \times 10^{-4}$
PZnPc ⁺	$(1,74 \pm 0,03) \times 10^{-3}$	0,66 \pm 0,04	$(1,13 \pm 0,02) \times 10^{-4}$
P ₄ ZnPc ⁴⁺	-	0,59 [86]	$(1,24 \pm 0,02) \times 10^{-4}$
M ₄ ZnPc	$(1,81 \pm 0,05) \times 10^{-3}$	0,69 \pm 0,05	$(1,52 \pm 0,03) \times 10^{-4}$

4.2.3.3. Producción de $O_2^{\cdot-}$ en medio microheterogeneo

El método de NBT fue empleado con el objetivo de determinar la producción de radical anión superóxido. La reducción de NBT por el $O_2^{\cdot-}$, en presencia de NADH, da a lugar a la generación de diformazán (Esquema 25) [141]. La producción del colorante en micelas inversas de *n*-heptano/AOT (0,1 M)/agua ($W_0=10$) fue detectada mediante el aumento de la absorbancia a 560 nm (Figura 41). Este incremento en la absorción fue monitoreado como una función del tiempo después de la irradiación de las muestras con luz visible.



Esquema 25. Detección de $O_2^{\cdot-}$ mediante la reducción de NBT a diformazán.

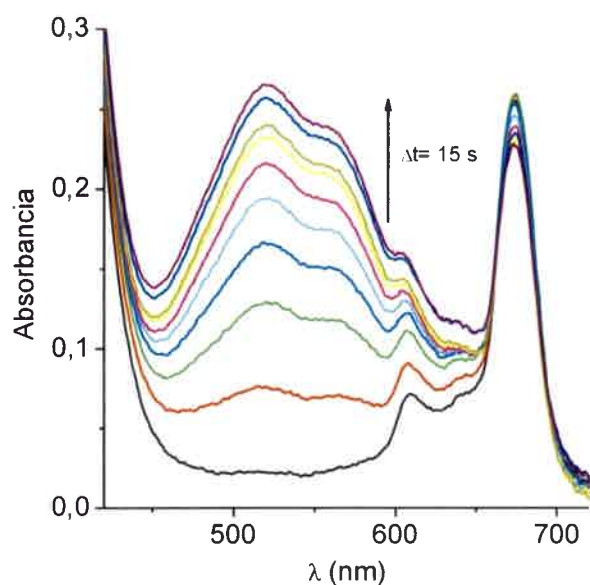


Figura 41. Espectros de absorción a distintos tiempos de irradiación para la reducción de NBT fotosensibilizada por P_4ZnPc^{4+} en de *n*-heptano/AOT (0,1 M)/agua ($W_0=10$).

Como se muestra en la Figura 42, en los ensayos controles, sin NBT o NADH, no fueron detectados cambios en la absorbancia debido a que no tuvo lugar la reacción entre NBT y $O_2^{\cdot-}$. La producción de formazán fue detectada también en ausencia de P_4ZnPc^{4+} , sin embargo la reducción de NBT es más eficiente en presencia del mismo. Los efectos de la irradiación de luz sobre el sistema micelar conteniendo P_4ZnPc^{4+} y NADH incrementa considerablemente la descomposición de NBT con respecto a la solución sin P_4ZnPc^{4+} indicando una importante contribución de la actividad fotodinámica inducida por el fotosensibilizador.

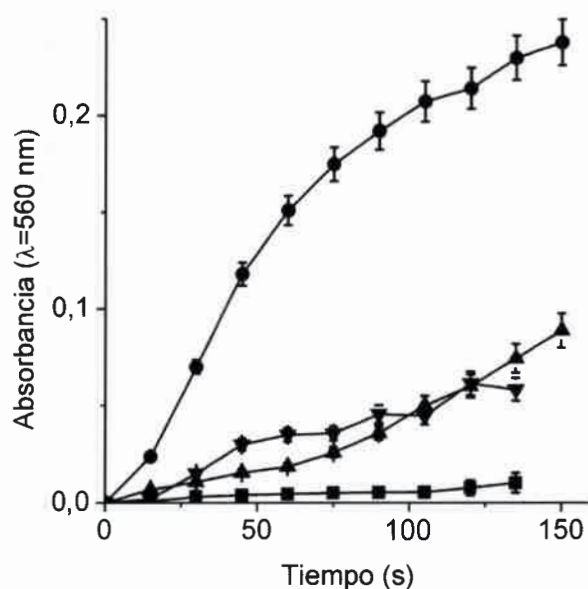


Figura 42. Absorbancia ($\lambda = 560$ nm) en función del tiempo de irradiación para $10 \mu M$ P_4ZnPc^{4+} , $0,2$ mM NBT y $0,5$ mM NADH (●), sin P_4ZnPc^{4+} (▲), sin NBT (▼); sin NADH (■) en micelas inversas de *n*-heptano/AOT ($0,1$ M)/ $W_0=10$.

4.2.4. Estudios en *Candida albicans*

4.2.4.1. PDI de suspensiones celulares de *C. albicans*

La PDI de *C. albicans* fue evaluada utilizando suspensión celular en PBS (10^6 UFC/mL) tratadas con $10 \mu M$ de ftalocianina por 30 min en oscuridad a $37^\circ C$ e irradiadas con luz visible por diferentes tiempos (Figura 43). Los experimentos controles muestran que la

viabilidad de *C. albicans* no fue afectada sólo con iluminación sin el fotosensibilizador o por incubación en la oscuridad con una concentración de 10 μM de ftalocianina. Estos resultados indican que la mortalidad celular obtenida luego de la irradiación de los cultivos tratados con las ftalocianinas es debido al efecto fotosensibilizador de los agentes inducido por la irradiación visible.

Como puede observarse en la Figura 43, la viabilidad de suspensiones de *C. albicans* incubadas con 10 μM de PZnPc y PZnPc⁺ e irradiadas por 30 min mostró una fotoinactivación con un decrecimiento menor a 0,5 log. En estudios previos fue demostrado que los fotosensibilizadores neutros o monocatiónicos son poco efectivos para la erradicación de *C. albicans*, en condiciones similares [40,170].

Por otro lado, las células de *C. albicans* son rápidamente fotoinactivadas cuando los cultivos son tratados con P₄ZnPc⁴⁺ y expuestas a la luz visible (Figura 43). Esta ftalocianina tetracatiónica produce una actividad fotosensibilizadora causando una disminución en la supervivencia celular de ~5 log, cuando los cultivos son tratados con 5 μM o 10 μM de P₄ZnPc⁴⁺ e irradiados por 30 min. Estos resultados representan un valor del >99,999% de inactivación celular. Un efecto similar fue obtenido para las células incubadas con 10 μM de P₄ZnPc⁴⁺ e irradiadas por 15 min. Inclusive, este tiempo de irradiación fue suficiente para producir una fotoinactivación elevada de *C. albicans* en presencia de 5 μM de P₄ZnPc⁴⁺. Así, la eficiencia en la actividad fotodinámica de P₄ZnPc⁴⁺ no varía significativamente a tiempos más prolongados de irradiación (30 min). Un comportamiento comparable al obtenido para P₄ZnPc⁴⁺ fueron previamente reportados para células de *C. albicans* tratados con zinc(II) tetrakis(3-metilpiridil)ftalocianina e irradiada con diferentes dosis de luz [105,171].

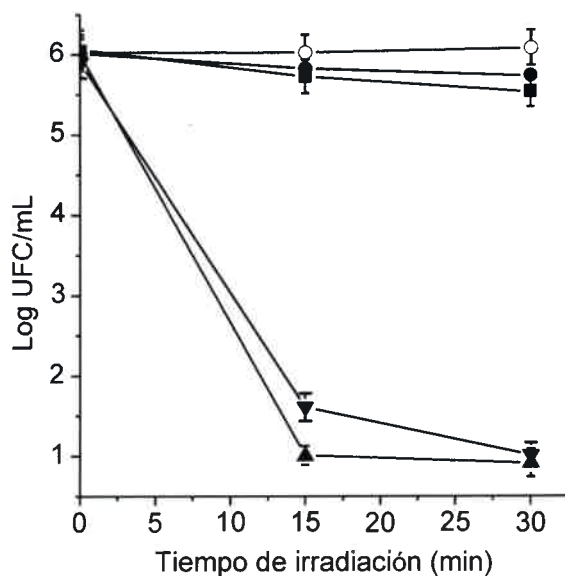


Figura 43. Sobrevivencia de *C. albicans* incubado con 10 μM de PZnPc (●), 10 μM de PZnPc⁺ (■), 5 μM de P₄ZnPc⁴⁺ (▼) y 10 μM de P₄ZnPc⁴⁺ (▲) por 30 min a 37 °C en oscuridad y expuesta a luz visible a diferentes tiempos de irradiación. Cultivos control sin tratar (○). Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes.

4.2.4.2. Unión de las ftalocianinas a células de *C. albicans*

La capacidad de la ftalocianina P₄ZnPc⁴⁺ para unirse a células de *C. albicans* fue analizada en una suspensión celular de $\sim 10^6$ UFC/mL en PBS. De esta manera, cultivos de *C. albicans* fueron incubados con una concentración de 5 μM y 10 μM del sensibilizador tetracatiónico por diferentes tiempos (15, 30 y 60 min) a 37°C en la oscuridad. La concentración intracelular del fotosensibilizador fue determinada por espectroscopía de fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}} = 670$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 684$ nm).

La unión del sensibilizador P₄ZnPc⁴⁺ en las células de *C. albicans* fue rápida a tiempos de incubación cortos (≤ 15 min), y dependiente de la concentración (Figura 44). La ftalocianina alcanza un valor máximo de unión a las células a los 15 min de incorporación, dando valores de ~ 2 nmol/ 10^6 células para 5 μM y un valor de ~ 4 nmol/ 10^6 células para 10 μM . Así, un aumento de la concentración al doble produce aproximadamente el mismo incremento en la unión celular de la ftalocianina, indicando que en estas condiciones aún no fue saturada la cantidad de fotosensibilizador en las células. Un tiempo de incubación

prolongado no causa un incremento apreciable de la cantidad de fotosensibilizador unido a células de *C. albicans*, ya que tiende a saturarse a los 30 min de incubación. Un comportamiento similar fue observado para *E. coli* en presencia de 2 μM de $\text{P}_4\text{ZnPc}^{4+}$ mostrando una máxima incorporación de ~ 0.80 nmoles/ 10^6 células a los 5 min de incubación [172].

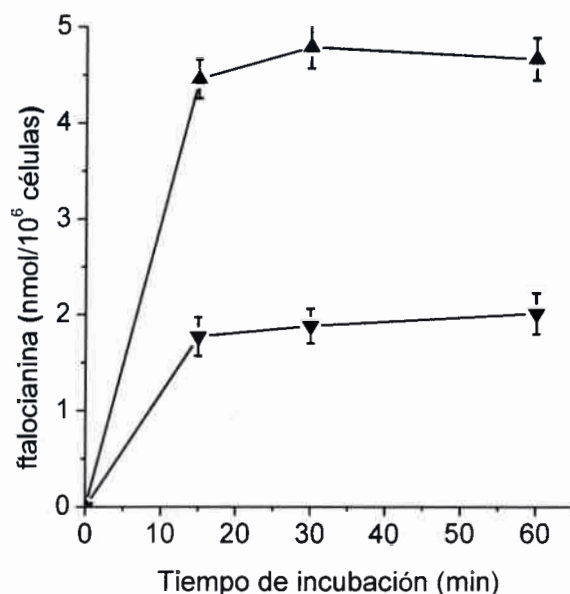


Figura 44. Cantidad de $\text{P}_4\text{ZnPc}^{4+}$ recuperada de células de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) tratadas con 5 μM (\blacktriangledown) y 10 μM (\blacktriangle) de sensibilizador a diferentes tiempos de incubación a 37 $^\circ\text{C}$ en oscuridad. Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes.

4.2.4.3. Efecto fotosensibilizado en la curva de crecimiento de *C. albicans*

El retardo en el crecimiento de cultivos de *C. albicans* fotosensibilizados con $\text{P}_4\text{ZnPc}^{4+}$ fue llevado a cabo en caldo Sabouraud (CS). Estos experimentos fueron realizados para asegurar que la PDI en células es posible cuando los cultivos está en condiciones de de crecimiento óptimas. La curva normal de crecimiento mostró una forma exponencial con una fase de latencia durante las primeras 2 h y una fase de crecimiento exponencial luego de este tiempo (Figura 45). A las 12 h aproximadamente, inicia la fase estacionaria y las células no

continúan su crecimiento de acuerdo a lo indicado por la medición de turbidez del cultivo a 550 nm. Así, 5, 10 y 20 μM del sensibilizador fueron agregados a cultivos frescos de *C. albicans* alcanzando la fase lag e irradiados con luz visible a 37 °C. Las células de *C. albicans* expuestas a la ftalocianina en la oscuridad o las iluminadas en ausencia del sensibilizador no mostraron un retardo en el crecimiento comparado con el control en la oscuridad y sin sensibilizador. Solamente los cultivos incubados con 20 μM de la ftalocianina mostraron toxicidad en la oscuridad.

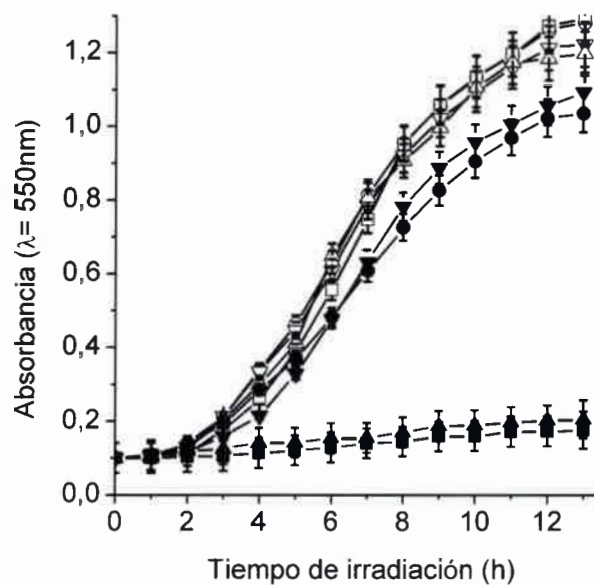


Figura 45. Curva de crecimiento de *C. albicans* incubadas con 5 μM (∇), 10 μM (\blacktriangle) y 20 μM (\blacksquare) de $\text{P}_4\text{ZnPc}^{4+}$ expuestas a diferentes tiempos de irradiación con luz visible en CS a 37 °C. Cultivos Control: células tratadas con 5 μM (∇), 10 μM (\triangle) y 20 μM (\bullet) en oscuridad, células sin sensibilizador pero irradiadas (\square) y en oscuridad (\circ) ($\lambda_{\text{abs}}=550 \text{ nm}$). Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados.

Como se observa en la Figura 45, el retardo de los cultivos irradiados con luz visible fue dependiente de la concentración de $\text{P}_4\text{ZnPc}^{4+}$. El crecimiento de *C. albicans* fue completamente frenado para las células tratadas con 10 y 20 μM de $\text{P}_4\text{ZnPc}^{4+}$ e iluminadas. Por lo tanto, el tratamiento con 10 μM de la ftalocianina es suficiente para evitar el crecimiento de *C. albicans* y producir la erradicación completa de la levadura post irradiación.

4.2.5. Ensayos en globulos rojos

La fotohemólisis de eritrocitos humanos producida por el derivado de ftalocianina P_4ZnPc^{4+} fue evaluada previamente [172]. El porcentaje de lisis celular de los glóbulos rojos fue dependiente de los tiempos de irradiación. Para una concentración de sensibilizador de 2 μM y 30 min de exposición a la luz, la hemólisis fue del 90 %. Por otra parte, el daño celular fue estudiado en presencia de azida. Fue evaluado el efecto producido por el ion azida empleando un rango de concentración entre 25 a 100 mM. El efecto fotohemolítico fue altamente dependiente de la concentración del inhibidor. La liberación de la hemoglobina disminuye a medida que aumenta la concentración de azida. En presencia de 50 mM de azida, el porcentaje de daño a los eritrocitos humanos fue reducido a un 15%.

4.3. Estudios de AN_3ZnPc^{3+} , TN_3ZnPc^{3+} y FN_3ZnPc^{3+}

4.3.1. Síntesis de ftalocianinas

Con la finalidad de desarrollar agentes fototerapéuticos con mayor eficiencia para la fotoinactivación de levaduras, fueron diseñados y sintetizados nuevos derivados de ftalocianinas con simetría A_3B .

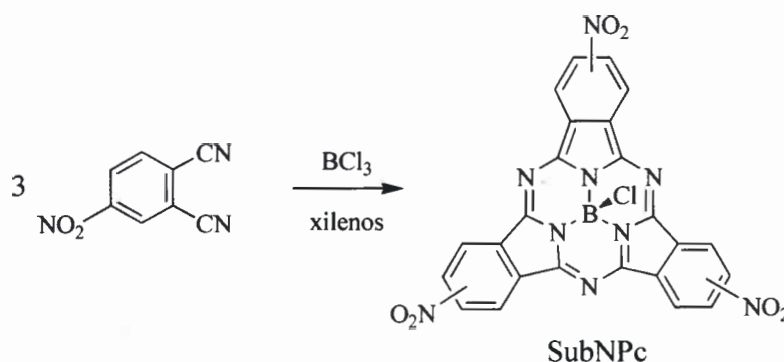
Además de las cargas positivas intrínsecas en una molécula, la combinación de sustituyentes hidrófobos e hidrófilos puede facilitar la penetración del agente a la membrana celular y aumentar la acumulación en los compartimentos subcelulares, ya que le brindan al sensibilizador un eje de polaridad intramolecular que aumenta la eficiencia de fotosensibilización. El diseño de la arquitectura del sensibilizador anfifílico requiere la formación de ftalocianinas con simetría A_3B que comprenden tres subunidades isoindol iguales (A) y una diferente (B). La simetría A_3B permite la incorporación de tres centros catiónicos y un grupo hidrófobo en la molécula incrementando así el carácter anfifílico de la misma.

Por este motivo, tres nuevas ftalocianinas tricatiónicas sustituidas fueron sintetizadas a partir de diferentes derivados de ftalonitrilo (Pn), mediante la reacción de expansión del anillo de SubNPc. Esta metodología permitió obtener ftalocianinas sustituidas por tres grupos nitro en la periferia del macrociclo.

La síntesis de AN_3ZnPc , fue realizada empleando un procedimiento de dos etapas. Primero, el derivado 4-[2-(1-adamantanil)etoxi]ftalonitrilo (APn) conteniendo una estructura

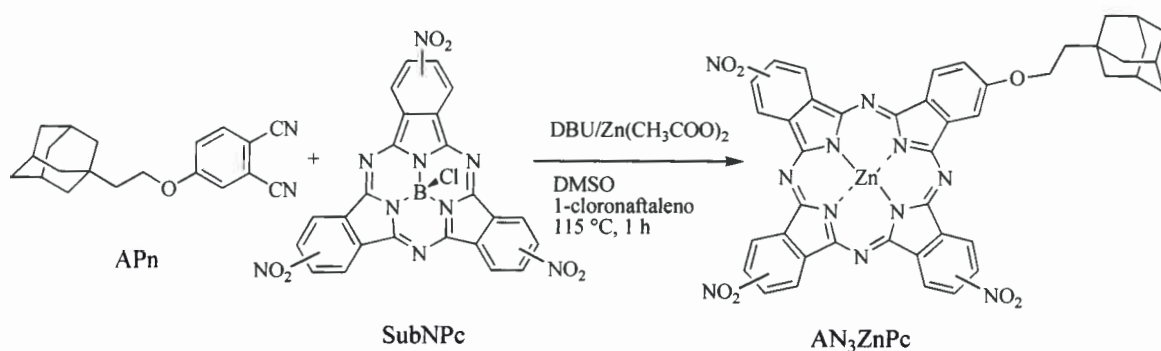
de adamantano fue preparado mediante la reacción de sustitución nucleofílica aromática (S_NAr) *ipso*-nitro entre 4-nitroftalonitrilo y de 2-(1-adamantil)etanol, como se describió previamente (Esquema 15).

Por otro lado, la síntesis de la trinitrosubftalocianina SubNPc fue obtenida mediante la condensación del 4-nitroftalonitrilo con BCl_3 en una mezcla de xilenos como solvente [134]. La reacción fue realizada a $130^\circ C$ durante 50 min. El producto de reacción fue separado por cromatografía en columna *flash* con un rendimiento del 68% (Esquema 26).



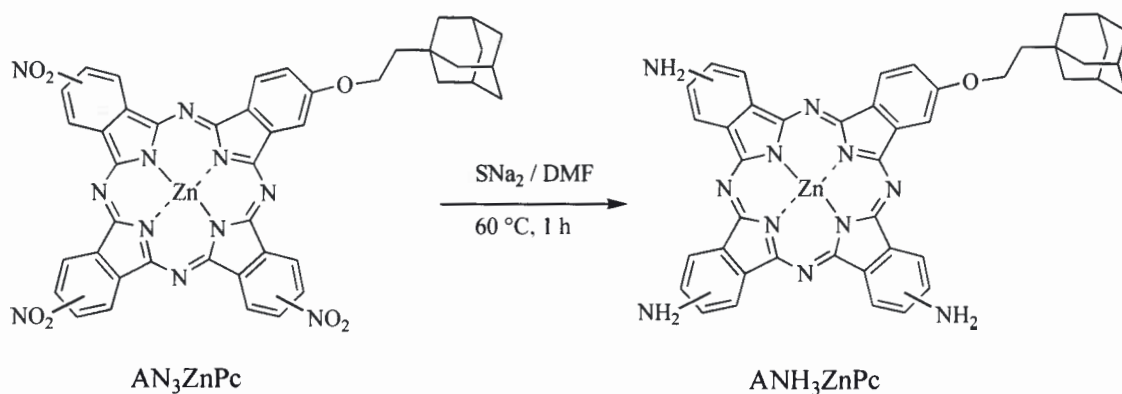
Esquema 26. Síntesis de la ftalocianina SubNPc.

Posteriormente, el derivado de ftalonitrilo APn fue utilizado para expandir el anillo de la SubNPc. Con este propósito, la reacción fue calentada a $115^\circ C$ durante 1 h, en presencia del catalizador DBU y de acetato de zinc. Luego, la mezcla de reacción fue enfriada a temperatura ambiente y precipitada con agua. El producto de la reacción fue purificado por lavado con agua y ciclohexano. El sólido fue separado por centrifugación y secado al vacío para obtener la ftalocianina AN_3ZnPc con un rendimiento del 20% (Esquema 27).



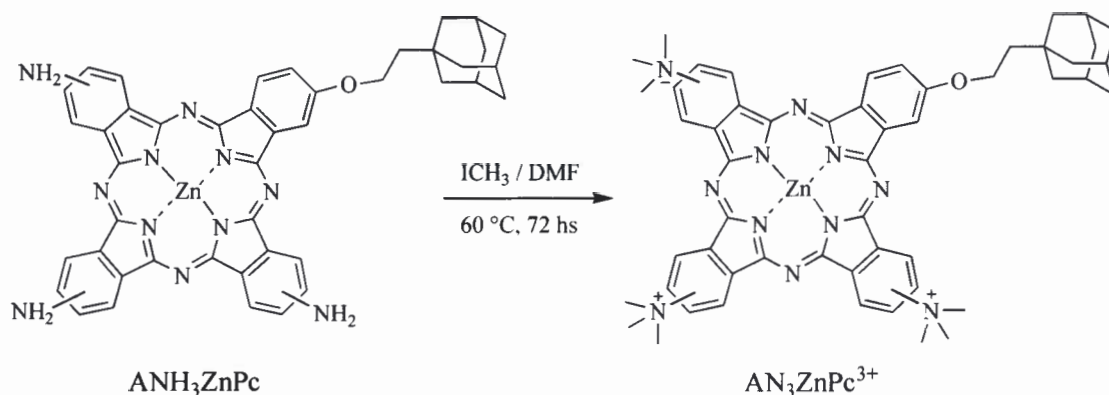
Esquema 27. Síntesis de la ftalocianina AN_3ZnPc .

En la etapa siguiente, AN_3ZnPc fue tratada con un exceso de Na_2S durante 1 h a $60\text{ }^\circ\text{C}$ en DMF. Luego, la mezcla de reacción fue precipitada en 50 mL de agua, centrifugada y lavada con agua. Estas condiciones de reacción permiten la reducción de los grupos nitro para obtener el derivado de ftalocianina ANH_3ZnPc con un 68% de rendimiento (Esquema 28).



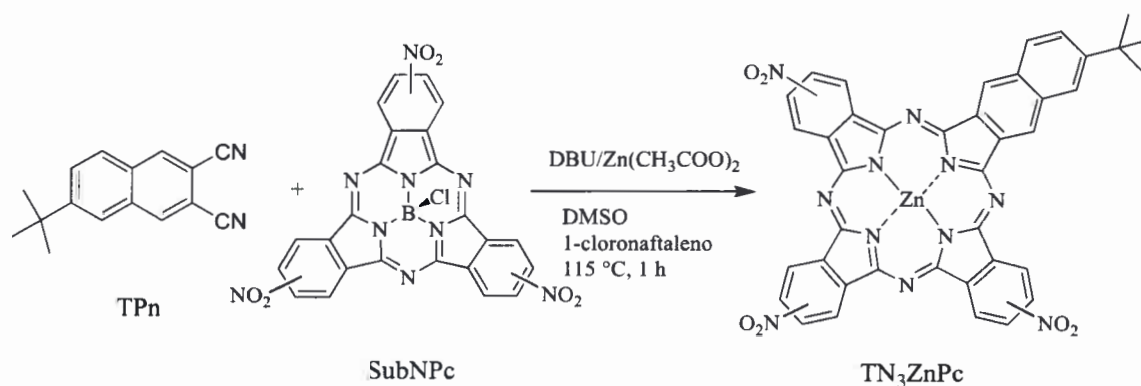
Esquema 28. Síntesis de la ftalocianina ANH_3ZnPc .

En la etapa final de síntesis, ANH_3ZnPc fue tratada con un exceso de yoduro de metilo a reflujo durante 72 h a $55\text{ }^\circ\text{C}$. El solvente fue evaporado a presión reducida. Luego, el producto fue lavado con ciclohexano. Este procedimiento permite obtener la ftalocianina tricatónica $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ con 95% de rendimiento (Esquema 29).



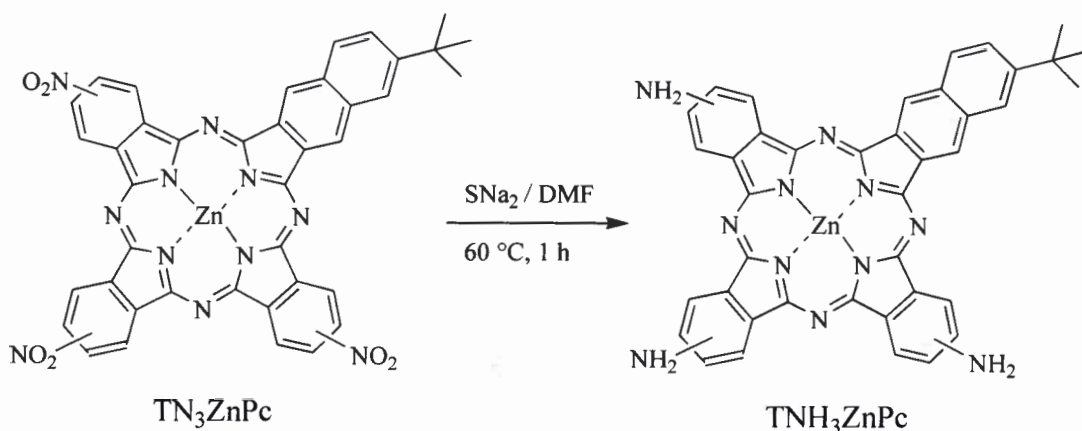
Esquema 29. Síntesis de la ftalocianina $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$.

La síntesis de TN_3ZnPc fue realizada por medio de la expansión del anillo de la SubNPc con el derivado de ftalonitrilo 6-(*tert*-butil)-2,3-dicianonaftaleno (TPn). Con este objetivo, la mezcla de reacción fue calentada a 115 °C durante 1 h, en presencia del catalizador DBU y de acetato de zinc. Luego, el sólido fue enfriado a temperatura ambiente y precipitado con agua. El producto de la reacción fue purificado por lavado con agua y ciclohexano, para obtener como producto la ftalocianina TN_3ZnPc con un rendimiento del 15% (Esquema 30).



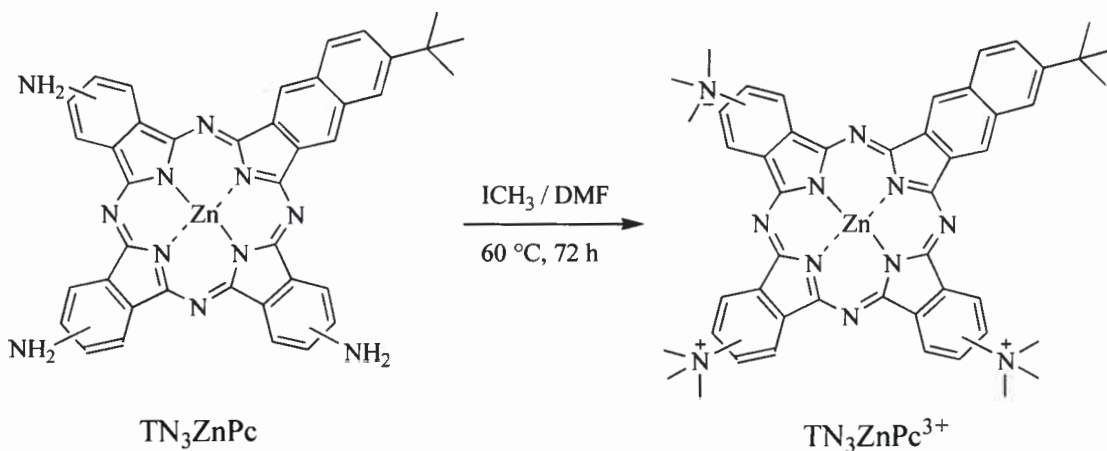
Esquema 30. Síntesis de la ftalocianina TN_3ZnPc .

En la etapa siguiente, TN_3ZnPc fue tratada con un exceso de Na_2S durante 1 h a $60\text{ }^\circ\text{C}$ en DMF. Estas condiciones de reacción permiten la reducción de los grupos nitro a los correspondientes grupos aminos. Posteriormente, la mezcla de reacción fue precipitada en 50 mL de agua, centrifugada y lavada con agua para obtener el derivado de ftalocianina TNH_3ZnPc con un 59% de rendimiento (Esquema 31).



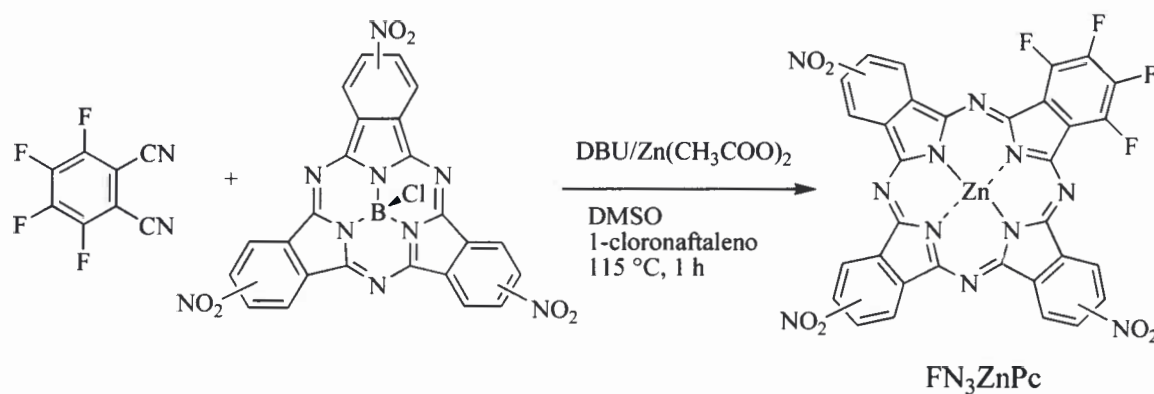
Esquema 31. Síntesis de la ftalocianina TNH_3ZnPc .

En la etapa final de síntesis, TNH_3ZnPc fue tratada con un exceso de yoduro de metilo a reflujo durante 72 h a $55\text{ }^\circ\text{C}$. El solvente fue evaporado a presión reducida. El producto fue lavado con ciclohexano. Este procedimiento permite obtener la ftalocianina tricatiónica $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ con un rendimiento del 96 % (Esquema 32).



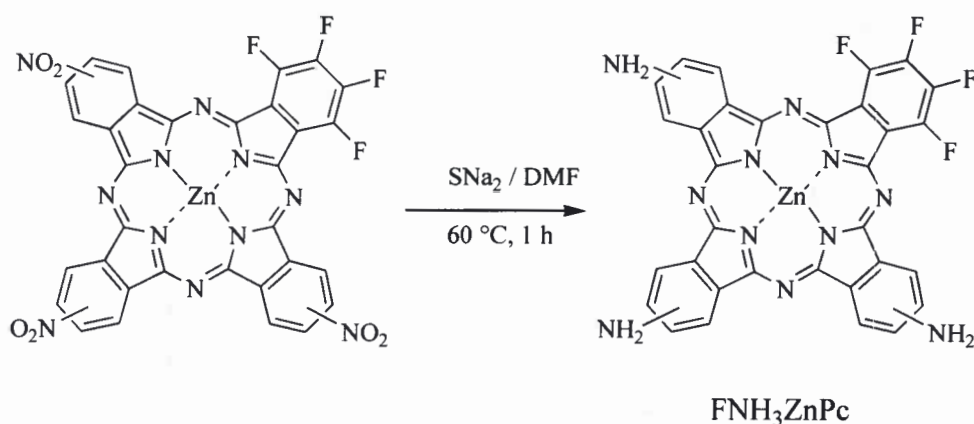
Esquema 32. Síntesis de la ftalocianina $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$.

La síntesis de FN₃ZnPc fue llevada a cabo mediante la expansión el anillo de la SubNPc con el derivado tetrafluorftalonitrilo (FPn). Con este propósito, la reacción fue calentada a 115 °C durante 1 h, en presencia del catalizador DBU y de acetato de zinc. Posteriormente, la mezcla de reacción fue enfriada a temperatura ambiente y precipitada con agua. El producto de la reacción fue purificado por lavado con agua y ciclohexano para producir la ftalocianina FN₃ZnPc con un rendimiento del 16 % (Esquema 33).



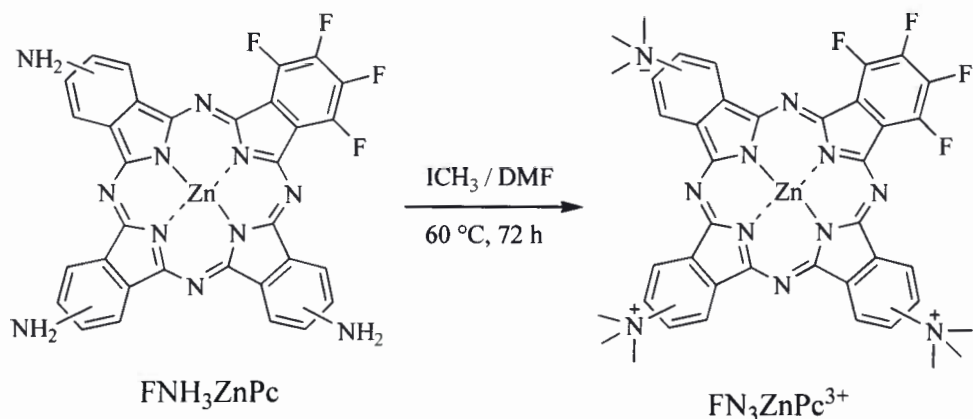
Esquema 33. Síntesis de la ftalocianina FN₃ZnPc.

Con el fin de obtener grupos aminos, en la etapa siguiente FN₃ZnPc fue tratada con un exceso de Na₂S durante 1 h a 60 °C en DMF. La mezcla de reacción fue precipitada en 50 mL de agua, centrifugada y lavada con agua para obtener el derivado de ftalocianina FNH₃ZnPc con un 66% de rendimiento (Esquema 34).



Esquema 34. Síntesis de la ftalocianina FNH₃ZnPc.

En la etapa final de síntesis, FNH_3ZnPc fue tratada con un exceso de yoduro de metilo a reflujo durante 72 h a 55 °C. El solvente fue evaporado a presión reducida. El producto fue lavado con ciclohexano. Este procedimiento permite obtener la ftalocianina tricatiónica $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ con un rendimiento del 94% (Esquema 35).



Esquema 35. Síntesis de $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$.

4.3.2. Estudios espectroscópicos

Los espectros de las zinc(II) ftalocianinas $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$, $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ y $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ en DMF muestran dos bandas Q , una más pequeña a ~ 600 nm y otra intensa a ~ 670 nm [147]. Los espectros de absorción de las ftalocianinas estudiadas fueron realizados en DMF (Figura 46). Los valores del coeficiente de extinción molar (ϵ) y λ_{max} de absorción están resumidos en la Tabla 5. Estos derivados de ftalocianinas presentan un importante ensanchamiento de la banda Q , esto puede deberse a que están parcialmente agregadas en DMF. Las bandas Q de $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ se desplazan hipsocrómicamente con respecto a M_4ZnPc , mientras que $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ y $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ presentan un corrimiento batocrómico (Figura 46). En el caso de $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ el corrimiento batocrómico se debe a la extensión de la conjugación del sistema π , además, puede observarse un desdoblamiento de la banda Q . En estudios previos, la división de la banda $Q(0,0)$ en híbridos de ftalocianinas y naftalocianinas fue asignada a la baja simetría de las moléculas [173].

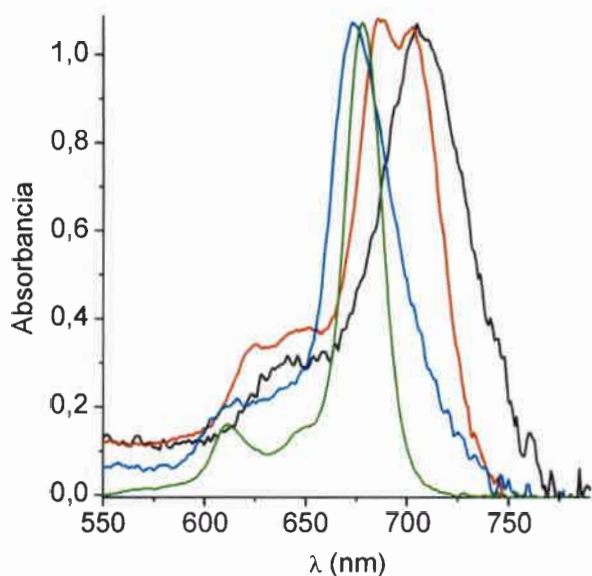


Figura 46. Espectros de absorción de las ftalocianinas AN₃ZnPc³⁺ (negro), TN₃ZnPc³⁺ (rojo), FN₃ZnPc³⁺ (azul) y M₄ZnPc (verde) en DMF.

Los espectros de emisión de fluorescencia presentan una banda centrada en ~731 nm para AN₃ZnPc³⁺, en ~722 nm para TN₃ZnPc³⁺ y en ~688 nm para FN₃ZnPc³⁺ (Figura 47).

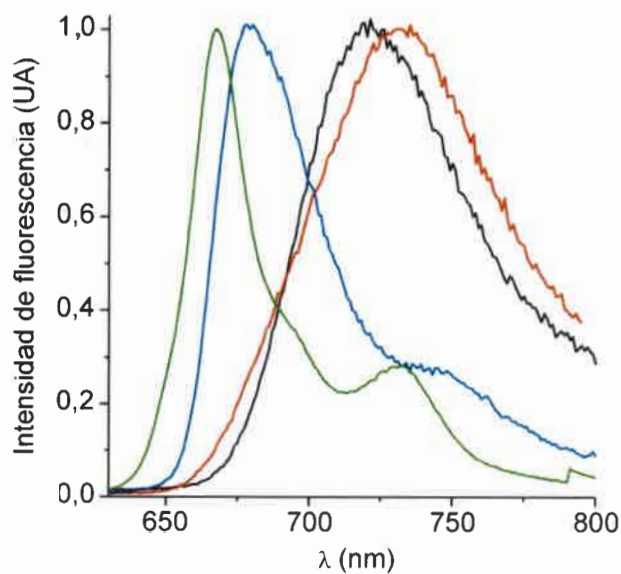


Figura 47. Espectros de emisión de fluorescencia de AN₃ZnPc³⁺ (negro), TN₃ZnPc³⁺ (rojo), FN₃ZnPc³⁺ (azul) y M₄ZnPc (verde) en DMF ($\lambda_{exc}=610$ nm).

Los valores de rendimiento de fluorescencia (Φ_F) en DMF fueron obtenidos por comparación con la referencia (M_4ZnPc). Estos valores de Φ_F se muestran en la Tabla 5. Los resultados concuerdan con aquellos reportados previamente para zinc(II) ftalocianinas similares en medios homogéneos [86]. La emisión de fluorescencia presenta valores de Φ_F apropiados para la detección y cuantificación del sensibilizador en medio biológico.

Tabla 5. Características espectroscópicas de las ftalocianinas y rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) en DMF.

Ftalocianinas	$\lambda_{\max}(\text{Abs})^a$	$\lambda_{\max}(\text{Emisión})$	$\epsilon (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$	Φ_F
$\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$	705	731	$1,15 \times 10^5$	$0,26 \pm 0,01$
$\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$	703	722	$1,02 \times 10^5$	$0,16 \pm 0,01$
$\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$	675	688	$1,20 \times 10^5$	$0,25 \pm 0,01$
$M_4\text{ZnPc}$	676	678	$2,01 \times 10^5$	$0,26 \pm 0,01$

^a absorción en la banda Q

La absorción de las ftalocianinas $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (Figura 48), $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (Figura 49), $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (Figura 50) fue estudiada en diferentes solventes orgánicos y agua. Para los tres sensibilizadores se observa una solubilidad significativa en DMSO y DMF, mientras que en diclorometano y ciclohexano la solubilidad como monómero es relativamente más baja. Por otra parte, las ftalocianinas tricatiónicas se encuentran principalmente agregadas en agua.

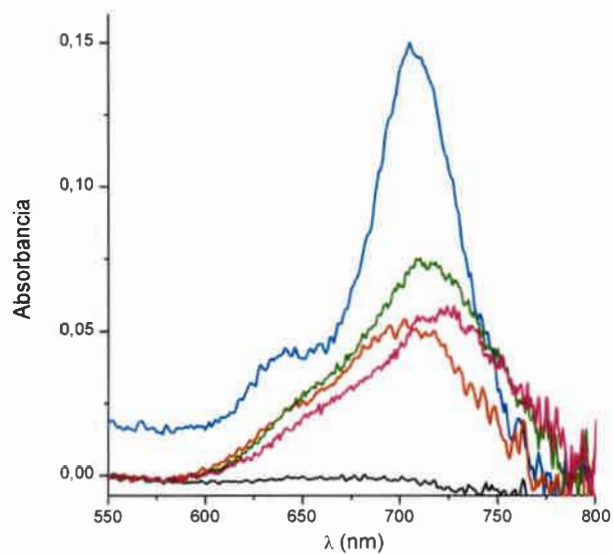


Figura 48. Espectros de absorción de AN₃ZnPc³⁺ en distintos medios. Agua (magenta), diclorometano (rojo), DMF (azul), DMSO (verde), ciclohexano (negro).

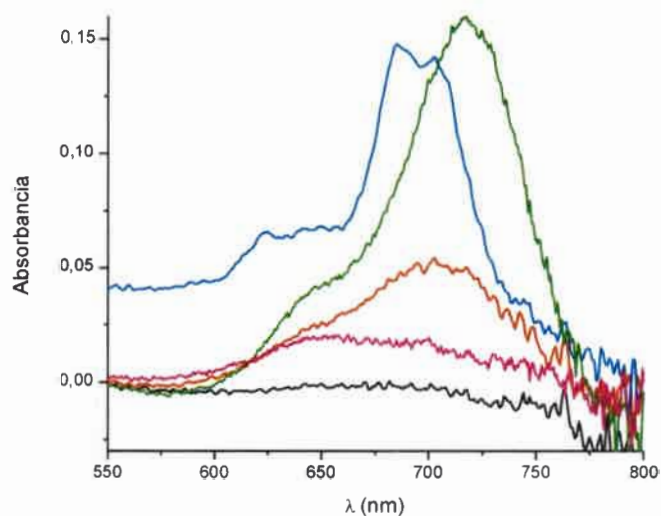


Figura 49. Espectros de absorción de TN₃ZnPc³⁺ en distintos medios. Agua (magenta), diclorometano (rojo), DMF (azul), DMSO (verde), ciclohexano (negro).

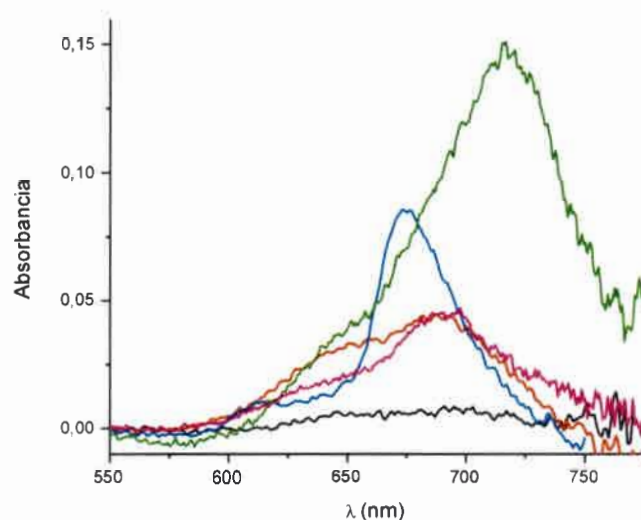


Figura 50. Espectros de absorción de $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ en distintos medios. Agua (magenta), diclorometano (rojo), DMF (azul), DMSO (verde), ciclohexano (negro).

4.3.3. Actividad fotodinámica

La producción de $^1\text{O}_2$ por las ftalocianinas fue estudiada en condiciones aeróbicas en presencia de DMA, irradiando las soluciones con luz monocromática en el máximo de absorción de la banda *Q*. La descomposición de DMA fotosensibilizada por las ftalocianinas fue estudiada en un medio homogéneo y uno microheterogéneo formado por micelas inversas de BHDC.

En la oscuridad, no se observaron cambios en los espectros de absorción del DMA en presencia de los sensibilizadores. Cuando las ftalocianinas fueron irradiadas, la fotooxidación puede seguirse espectroscópicamente por la desaparición de las bandas características del DMA a 378 nm (Figura 51). Por otra parte, la absorción de las ftalocianinas permanece constante durante el proceso de irradiación, mostrando que los fotosensibilizadores son estables en estas condiciones experimentales.

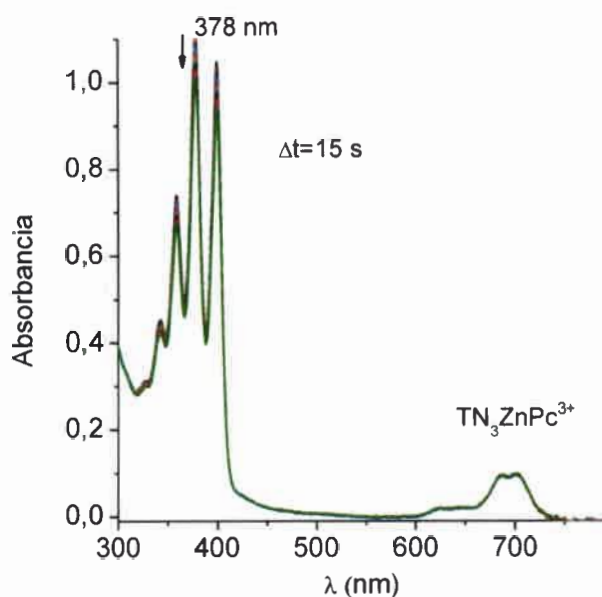


Figura 51. Espectros de absorción a distintos tiempos de irradiación para la fotooxidación de DMA sensibilizada por TN_3ZnPc^{3+} en DMF ($\lambda_{irr}=686nm$).

4.3.3.1. Medio homogéneo

En la Figura 52 se muestran las gráficas semilogarítmicas típicas que describen el progreso de la reacción para DMA fotosensibilizada por ftalocianinas en DMF irradiando el sistema en la banda Q . A partir de las pendientes de estos gráficos fueron obtenidas las constantes de velocidad observadas (k_{obs}^{DMA} , Tabla 6).

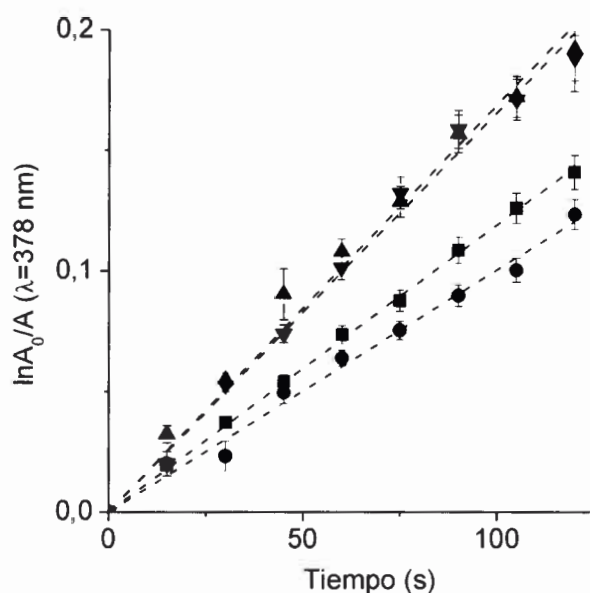


Figura 52. Fotooxidación de DMA (35 μM) sensibilizado por ftalocianinas en DMF. Gráfico de primer orden para las ftalocianinas $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (■), $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (●), $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (▲) y M_4ZnPc (▼) (λ_{irr} =máximo de la banda Q). Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados.

Los valores de Φ_{Δ} fueron calculados comparando las pendientes de $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$, $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ y $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ con la correspondiente a la referencia M_4ZnPc . En DMF las ftalocianinas fotodescomponen DMA a velocidades similares, indicando que estos sensibilizadores presentan una producción comparable de $^1\text{O}_2$. Como se puede observar en la Tabla 6, $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$, $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$, $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ y M_4ZnPc presentan una mayor eficiencia en la producción de $^1\text{O}_2$ en DMF que la correspondiente a la ZnPc $\Phi_{\Delta}=0,56$ [138,147].

4.3.3.2. Medio microheterogéneo

Las ftalocianinas $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$, $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ y $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ no fueron disueltas como monómeros en micelas inversas aniónicas de n-heptano/AOT (0,1 M)/ agua ($W_0=10$), por esta razón la actividad fotodinámica de los sensibilizadores fue analizada en micelas inversas catiónicas de benceno/BHDC (0,1 M)/agua ($W_0=10$). En estos sistemas, el soluto puede localizarse en diferentes microentornos: el solvente orgánico externo, el centro acuoso o la

interfase micelar [44]. Las micelas inversas de BHDC podrían presentar un microentorno que facilite la solubilidad de los agentes.

La descomposición de DMA fue estudiada en las micelas inversas de BHDC en condiciones aeróbicas (Figura 53). Debido al carácter no polar del DMA, puede asumirse que este sustrato está principalmente disuelto en la fase orgánica (benceno) del sistema micelar. En este microentorno, el sustrato reacciona con el $^1\text{O}_2$ producido por fotosensibilización debida a la ftalocianina. En la Tabla 6 se muestran los valores de k_{obs} para la fotooxidación de DMA en micelas por parte de las ftalocianinas en estudio. Los cuatro fotosensibilizadores mantienen una actividad fotodinámica similar y acorde a la producción de $^1\text{O}_2$ encontrada en medio homogéneo. Sin embargo, al comparar los resultados en las micelas de BHDC con los obtenidos en DMF, la velocidad de fotodescomposición de DMA es un orden de magnitud menor en el sistema micelar. Este comportamiento puede ser debido a un cambio en la velocidad de reacción del DMA en benceno con respecto a DMF y a la distribución del $^1\text{O}_2$ en la interfase micelar.

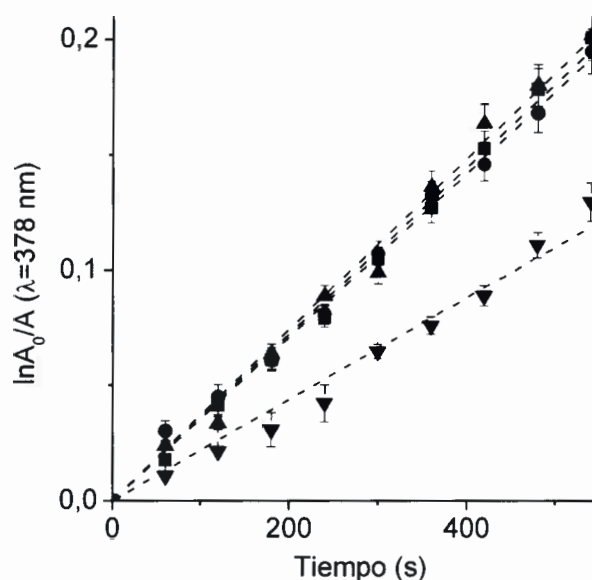


Figura 53. Fotooxidación de DMA ($35 \mu\text{M}$) sensibilizado por ftalocianinas. Gráfico de primer orden para las ftalocianinas $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (●), $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (■), $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (▲) y M_4ZnPc (▼) en micelas inversas de benceno/BHDC ($0,1 \text{ M}$)/agua ($W_0=10$) (λ_{irr} = máximo de la banda Q). Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados.

Tabla 6. Parámetros cinéticos (k_{obs}) para la descomposición de DMA sensibilizada por ftalocianinas en DMF, en micelas inversas de benceno/BHDC (0,1 M)/agua ($W_0=10$) y rendimientos cuánticos de producción de $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ).

Ftalocianinas	$k_{\text{obs}}^{\text{DMF}}$ (s^{-1})	Φ_Δ	$k_{\text{obs}}^{\text{BHDC}}$ (s^{-1})
$\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$	$(1,18 \pm 0,03) \times 10^{-3}$	$0,64 \pm 0,04$	$(3,74 \pm 0,02) \times 10^{-4}$
$\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$	$(0,99 \pm 0,04) \times 10^{-3}$	$0,60 \pm 0,05$	$(3,49 \pm 0,04) \times 10^{-4}$
$\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$	$(1,59 \pm 0,03) \times 10^{-3}$	$0,68 \pm 0,05$	$(3,82 \pm 0,02) \times 10^{-4}$
M_4ZnPc	$(1,64 \pm 0,05) \times 10^{-3}$	$0,69 \pm 0,05$	$(2,38 \pm 0,03) \times 10^{-4}$

4.3.4. Estudios en *Candida albicans*

4.3.4.1. PDI de suspensiones celulares de *C. albicans*

La PDI de *C. albicans* fue evaluada utilizando suspensión celular en PBS (10^6 UFC/mL) tratadas con $10 \mu\text{M}$ de las ftalocianinas por 30 min en oscuridad a 37°C e irradiadas con luz visible por diferentes tiempos. Los experimentos controles muestran que la viabilidad de *C. albicans* no fue afectada sólo por irradiación sin fotosensibilizador o por incubación en la oscuridad con una concentración de $10 \mu\text{M}$ de ftalocianina. Por lo tanto, la inactivación de levaduras observada después de la irradiación de los cultivos tratados con las ftalocianina es debido al efecto fotosensibilizador del agente inducido por la irradiación visible (Figura 54).

La viabilidad de *C. albicans* tratadas con $10 \mu\text{M}$ de ftalocianina e irradiadas por 30 min con luz visible fue de 2 y 2,5 log para $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ y $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$, respectivamente (Figura 54). Si bien los valores de Φ_Δ obtenidos, indican una eficiencia elevada en la producción de $^1\text{O}_2$ para estas ftalocianinas, este ensayo muestra que el medio biológico puede influir significativamente en las propiedades de los sensibilizadores, afectando la PDI de los microorganismos.

Por otra parte, las células fúngicas fueron rápidamente fotoinactivadas cuando los cultivos fueron tratados con $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ y expuestos a la luz visible. Esta ftalocianina tricatiónica produjo una fotosensibilización celular causando una disminución en la

supervivencia de las levaduras de 6 log, cuando los cultivos son tratados con 10 μM de la ftalocianina e irradiados por 30 min. Estos resultados representan un valor del >99,999% de inactivación celular. Inclusive en estas condiciones, 15 min de irradiación fueron suficientes para producir una muerte celular de 5 log (Figura 54).

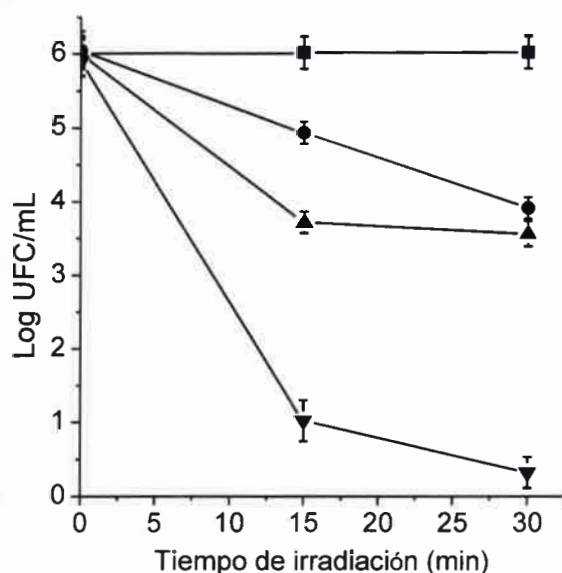


Figura 54. Curva de supervivencia de *C. albicans* (10^6 UFC/mL) incubada con 10 μM de AN₃ZnPc³⁺ (▲), TN₃ZnPc³⁺ (●) y FN₃ZnPc³⁺ (▼) a distintos tiempos (15 y 30 min) a 37°C en oscuridad y expuesta a luz visible por 30 min. Control sin tratar (▼). Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

La PDI de *C. albicans* fue evaluada en suspensión celular de ($\sim 10^6$ células/ml) con PBS tratadas con 1 μM de FN₃ZnPc³⁺. La PDI sobre las células de *C. albicans* fue de ~ 3 log para una concentración de 1 μM del fotosensibilizador. Estos resultados indican que la viabilidad de *C. albicans* luego de la irradiación con 30 min en presencia de FN₃ZnPc³⁺ fue dependiente de la concentración de la ftalocianina usada en el tratamiento. Bajo estas condiciones, el aumento en la concentración del fotosensibilizador fue acompañada por un incremento en la eficiencia de la PDI. Estos resultados representan un valor del 99,9 % de inactivación celular.

4.3.4.2. Unión de las ftalocianinas a células de *C. albicans*

En base a los resultados de inactivación obtenidos, fue llevado a cabo el estudio de incorporación del fotosensibilizador $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ en las células de *C. albicans*.

La capacidad de $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ para unirse a células de *C. albicans* fue analizada en suspensión celular de $\sim 10^6$ UFC/mL en PBS. De esta manera, cultivos de *C. albicans* fueron incubados con una concentración de $1 \mu\text{M}$ de la ftalocianina por diferentes tiempos (5, 15 y 30 min) a 37°C en oscuridad. La concentración intracelular del fotosensibilizador fue determinada por espectroscopia de fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}} = 673 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 688 \text{ nm}$).

La incorporación del sensibilizador $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ en las células de *C. albicans* fue rápida a tiempos de incubación cortos (Figura 55). La ftalocianina alcanza un máximo de unión a las células a los 5 min de incorporación, alcanzando un valor de $\sim 0,95$ nmoles/ 10^6 . Un tiempo de incubación prolongado no causa un incremento apreciable en la cantidad de fotosensibilizador unido a células de *C. albicans*, ya que tiende a saturarse a los 30 min de incubación.

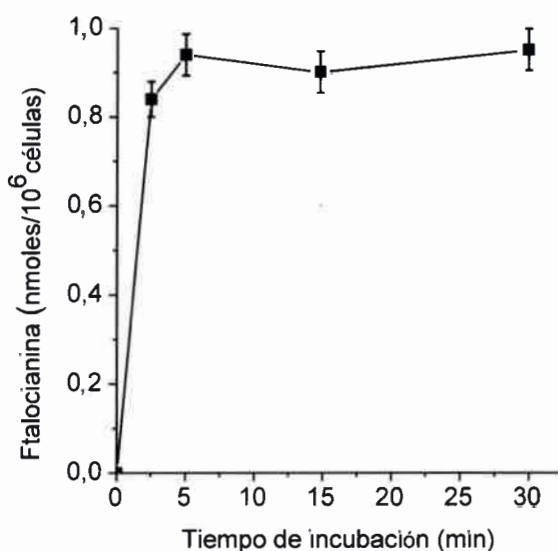


Figura 55. Cantidad de $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ recuperada de células de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) tratadas con $1 \mu\text{M}$ (■) de sensibilizador a diferentes tiempos de incubación a 37°C en oscuridad. Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes.

4.3.4.3. Efecto fotosensibilizado en la curva de crecimiento de *C. albicans*

El efecto en el crecimiento de los cultivos de *C. albicans* sensibilizados con $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$, $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$, y $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ fue llevado a cabo en caldo Sabouraud (CS). Estos estudios demostraron que el retardo en el crecimiento debido a la fotosensibilización de levaduras es aún posible cuando las células están en condiciones nutritivas, sin los efectos producidos por el buffer fosfato usado en los lavados y diluciones [140]. Así, $10 \mu\text{M}$ de los sensibilizadores fueron agregados a cultivos frescos de *C. albicans* alcanzando la fase lag de crecimiento e irradiados con luz visible a 37°C . Como podemos observar en la Figura 56 la curva de crecimiento mostró una fase de latencia durante las primeras 3 h y una fase de crecimiento exponencial luego de este tiempo en el cultivo control. Transcurridas aproximadamente 12 h, acercándonos al final de la serie de mediciones, fue apreciado el inicio de la fase estacionaria, las células no continúan su crecimiento de acuerdo a lo indicado por la medición de turbidez del cultivo a 650 nm.

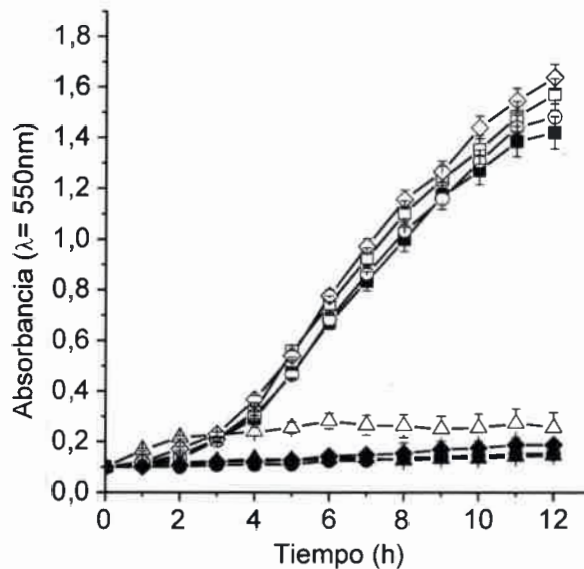


Figura 56. Curva de retardo del crecimiento de *C. albicans* incubadas con $10 \mu\text{M}$ $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (\blacktriangle), $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (\bullet) $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (\blacklozenge) expuestas a diferentes tiempos de irradiación en CS a 37°C . Cultivos control (\square) y control iluminado (\blacksquare) y células tratadas con $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (\triangle), $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (\circ) y $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (\diamond) mantenidas en oscuridad. Los valores representan la media \pm desviación estándar.

Por otra parte, células de *C. albicans* expuestas a las ftalocianinas en la oscuridad o iluminadas en ausencia del sensibilizador no mostraron un retardo en el crecimiento comparado con los controles, a excepción de $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ que bajo estas condiciones resultó tóxica en la oscuridad. Por lo tanto, los datos ilustran que el retardo del crecimiento observado fue debido al efecto de la PDI del sensibilizador sobre las células.

Estos valores de PDI son similares a los encontrados con $10\ \mu\text{M}$ de $\text{P}_4\text{ZnPc}^{4+}$ e irradiación. Bajo estas condiciones las tres ftalocianinas $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$, $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ y $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ mostraron valores apropiados de PDI. Sin embargo, $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ es más efectiva para fotoinactivar *C. albicans* en suspensiones celulares en PBS de acuerdo a lo demostrado anteriormente.

4.3.5. Ensayos en globulos rojos

4.3.5.1. Fotohemólisis de glóbulos rojos por ftalocianinas

La hemoglobina liberada por la hemólisis de los glóbulos rojos se evaluó por espectroscopía de absorción a 413 nm. La Figura 57 muestra resultados espectroscópicos característicos del sobrenadante de suspensiones de glóbulos rojos, obtenidos mediante la separación de las células por centrifugación, tratados con $10\ \mu\text{M}$ $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ e irradiados durante 15 min con luz visible. La suspensión de los eritrocitos en agua destilada produce 100% de hemólisis, mostrando el espectro de la hemoglobina de mayor intensidad con un máximo de absorbancia a 413 nm en agua. Como se mencionó anteriormente en los controles oscuridad e irradiados sin la ftalocianina prácticamente no se observa liberación de la hemoglobina a la solución.

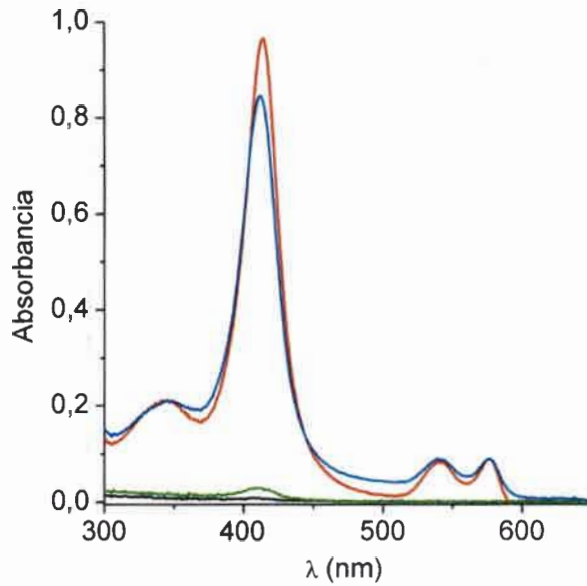


Figura 57. Espectro de absorción característico del sobrenadante de una suspensión de glóbulos rojos después de la separación de las células por centrifugación, eritrocitos en agua destilada, 100% hemólisis (rojo), eritrocitos tratados con $10 \mu\text{M AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ e irradiados durante 15 min con luz visible (azul), control oscuridad (verde) y control sin fotosensibilizador (negro). Las células fueron centrifugadas a 3000 rpm por 15 min y $100 \mu\text{L}$ del sobrenadante fue disuelto en 2 mL de agua destilada.

La fotohemólisis de los eritrocitos humanos fue utilizada para evaluar la actividad fotodinámica de $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$, $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$, y $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ en un modelo de membrana *in vitro*. La toxicidad celular inducida por los fotosensibilizadores fue analizada primero en la oscuridad (Figura 58). Las suspensiones de glóbulos rojos fueron tratadas con las ftalocianinas ($1\text{-}10 \mu\text{M}$) durante 30 min a temperatura ambiente. Bajo estas condiciones experimentales, los sensibilizadores $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ y $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ no producen una hemólisis significativa, mientras que $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ presenta toxicidad en la oscuridad. La iluminación de los eritrocitos sin tratar, a la dosis de luz utilizada, no induce fotohemólisis. La hemólisis obtenida después de irradiar a los glóbulos rojos tratados con las ftalocianinas es debida al efecto de fotosensibilización del agente producida por la luz visible.

La hemólisis fue dependiente de la concentración de agente fotosensibilizador utilizado (Figura 58). Para $10 \mu\text{M}$ de las ftalocianinas y después de 15 min de irradiación, la mayor hemólisis fue producida en las células sensibilizadas con $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$, obteniendo un

porcentaje del ~88%, mientras que $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ produjo ~74%. En contraste con estos resultados, solamente un 18% de hemólisis fue obtenido para los eritrocitos tratados con $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$, en las mismas condiciones. Así la alta actividad encontrada para $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ puede corresponderse posiblemente a estar localizada en un microentorno celular que facilita su solubilización en forma monomérica. Este también parece ser el caso para $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$, aunque el fotodaño es menor que el producido por $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$. Por otro lado, la baja hemólisis sensibilizada por $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$, puede deberse a una extensa agregación en la suspensión de glóbulos rojos. Estos resultados indican que la actividad fotodinámica en el medio biológico depende principalmente de la capacidad de incorporación del sensibilizador al medio celular y de la solubilización como monómeros.

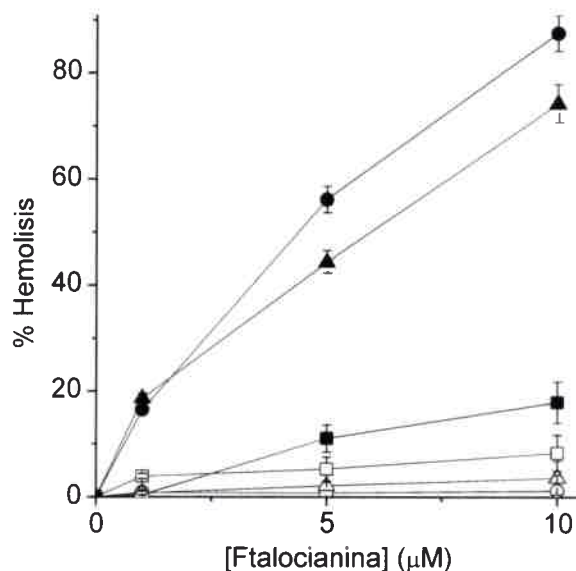


Figura 58. Porcentaje de hemólisis producida en glóbulos rojos tratados durante 30 min a distintas concentraciones de $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (○), $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (□) y $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (△) en la oscuridad e irradiados con luz visible durante 15 min, $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (●), $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (■) y $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (▲). Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

Por lo tanto, de las tres ftalocianinas tricatiónicas estudiadas, $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ es la más efectiva para producir la fotohemólisis de los glóbulos rojos. Resultados similares fueron

encontrados previamente para la ftalocianina AZnPc monosustituida con un grupo adamantano. Después de 30 min de irradiación, un 98% de hemólisis fue producida en las células sensibilizadas con 5 μ M de AZnPc. La incorporación de un grupo adamantano en la periferia de la molécula parece favorecer la interacción del fotosensibilizador en las membranas citoplasmáticas de las células de eritrocitos.

5. CONCLUSIONES

5. Conclusiones

Los derivados de ftalocianinas son exclusivamente obtenidos mediante la síntesis en el laboratorio. Estos compuestos corresponden a las porfirazinas más estudiadas y mejor conocidas. En los últimos años la atención se ha centrado en los métodos de preparación de los complejos asimétricos. La relación hidrofobicidad/hidrofilicidad es importante cuando se considera la incorporación y la localización intracelular en los microorganismos. El macrociclo de las ftalocianinas es esencialmente hidrofóbico por lo que el anillo sin sustituir es poco efectivo [174]. Por lo tanto, es conveniente variar las propiedades anfífilas de las ftalocianinas mediante la presencia de grupos sustituyentes.

5.1. Ftalocianinas neutras AZnPc y A₄ZnPc

Nuevos derivados de zinc(II) ftalocianinas sustituidos por unidades de adamantano (AZnPc y A₄ZnPc) fueron sintetizados a partir del correspondiente ftalonitrilo (APc). La ftalocianina AZnPc con simetría A₃B fue obtenida mediante la reacción de expansión del anillo de la SubPc con un rendimiento del 15 %. La principal ventaja de este procedimiento para obtener ftalocianinas A₃B radica en la formación de un único producto, el cual es relativamente sencillo de purificar. La ftalocianina A₄ZnPc con una estructura A₄ fue directamente formada a partir de la ciclotrimerización del ftalonitrilo APn con un 27 % de rendimiento. Si bien estos rendimientos no son muy altos, son los esperados para la formación de ftalocianinas utilizando dinitrilos sustituidos por grupos voluminosos.

Los estudios espectroscópicos de absorción muestran que AZnPc y A₄ZnPc presentan las bandas Q a $\lambda \sim 670$ nm en DMF, características de las ftalocianinas disueltas en forma monomérica. Sin embargo, principalmente para A₄ZnPc, esta banda se ensancha y disminuye la intensidad en solventes orgánicos polares y en agua debido a la formación de agregados. Uno de los problemas principales que afecta la habilidad fotosensibilizadora de las ftalocianinas es la tendencia a agregarse, debido al gran sistema conjugado π del macrociclo. Los agregados presentan un camino de relajación para la pérdida de energía no radiativa, disminuyendo la formación de estado triplete ($^3\text{Sens}^*$) y consecuentemente la producción de $^1\text{O}_2$. Por lo tanto, la formación de agregados repercute negativamente en la actividad fotodinámica. Estos derivados de ftalocianinas muestran una emisión de fluorescencia con

$\Phi_F \sim 0,1-0,3$. Estos valores de Φ_F son adecuados para la cuantificación del sensibilizador en medios biológicos y para realizar estudios de localización intracelular.

Las ftalocianinas AZnPc y A₄ZnPc presentan una elevada producción de ¹O₂ ($\Phi_\Delta \sim 0,7$) en DMF. Sin embargo, los valores de Φ_Δ pueden cambiar significativamente en diferentes medios, disminuyendo cuando el sensibilizador está parcialmente agregado. Se ha demostrado que existen limitaciones para predecir la eficiencia fotodinámica del sensibilizador en sistemas biológicos sobre la base de investigaciones fotofísicas en solución. En un sistema biomimético simple, como lo son las micelas inversas de AOT, AZnPc interacciona fuertemente con las mismas y produce la fotooxidación de DMA de manera eficiente en comparación con A₄ZnPc y M₄ZnPc.

Los estudios *in vitro* permitieron evaluar la actividad fotodinámica de estas ftalocianinas frente a microorganismos y células de eritrocito humano.

Los fotosensibilizadores AZnPc y A₄ZnPc mostraron una inactivación menor a 1 Log en las células de *C. albicans*. Estos valores indican que estas ftalocianinas no son eficientes para producir una completa erradicación de los microorganismos mediante tratamientos de PDI.

La eficiencia de los distintos fotosensibilizadores puede variar significativamente dependiendo del objetivo biológico. La membrana celular es un objetivo importante para numerosos agentes antineoplásicos. En este sentido, los eritrocitos de mamíferos constituyen un sistema modelo atractivo y adecuado para estudiar el fotodaño en las membranas. Cuando se utilizaron glóbulos rojos como modelo celular para tratamientos de PDT, el fotosensibilizador AZnPc fue el más activo para producir la hemólisis. Con solo 5 min de irradiación con luz visible, 5 μ M de AZnPc produce un 80% de ruptura hemolítica. Este efecto es superior al producido por M₄ZnPc y A₄ZnPc. Además, la fotohemólisis sensibilizada por AZnPc produce un aumento en la fluidez de la membrana. Los daños en la membrana conducen a una disminución en la resistencia osmótica de los eritrocitos tratados mediante PDT. En los estudios del mecanismo de fotohemólisis en glóbulos rojos se determinó que la presencia del ion azida produce una disminución del fotodaño, mientras que D-manitol no afecta significativamente la hemólisis celular. Por lo tanto, la presencia de ¹O₂ sería la principal especie fotocitotóxica que daña la membrana celular.

Los resultados indican que la estructura de AZnPc, conteniendo una unidad de adamantano, representa un potencial agente fototerapéutico para tratamientos de PDT.

5.2. Ftalocianinas catiónicas PZnPc⁺ y P₄ZnPc⁴⁺

En una segunda etapa de trabajo se continuó con la síntesis de ftalocianinas con simetría A₃B y A₄, con la finalidad de desarrollar agentes fototerapéuticos para la fotoinactivación de levaduras. Teniendo en cuenta que las cargas positivas permiten una mejor interacción del fotosensibilizador con la envoltura celular de *C. albicans*, se sintetizaron nuevos agentes catiónicos. Así, la ftalocianina monocatiónica PZnPc⁺ fue obtenida a partir de la reacción de expansión de una subftalocianina. Por otro lado, mediante la reacción de ciclotetramerización se obtuvo una ftalocianina tetracatiónica, P₄ZnPc⁴⁺. En estos complejos el centro catiónico se encuentra aislado del macrociclo por una función éter. Esto provee una mayor movilidad a la carga, lo cual podría facilitar las interacciones con la pared de *C. albicans*. Además, las cargas positivas aisladas del anillo tienen mínima influencia sobre las propiedades fotofísicas de los sensibilizadores.

Los estudios espectroscópicos de absorción en DMF muestran las bandas Q intensas ($\epsilon > 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a $\lambda_{\text{max}} \sim 669 \text{ nm}$ para PZnPc y PZnPc⁺ y a $\lambda_{\text{max}} = 680 \text{ nm}$ para P₄ZnPc⁴⁺. Los derivados de ftalocianina monosustituidos muestran un rendimiento cuántico de fluorescencia de 0,32, mientras que P₄ZnPc⁴⁺ presenta un valor de 0,22. La emisión de fluorescencia fue adecuada para cuantificar la presencia de las ftalocianinas en las células de *C. albicans*.

Los sensibilizadores presentan una elevada producción de ¹O₂ en DMF. ZnPc y ZnPc⁺ muestran $\Phi_{\Delta} \sim 0,7$, por otro lado P₄ZnPc⁴⁺ presenta un valor de 0,59. Sin embargo, los valores de Φ_{Δ} pueden variar dependiendo del microentorno en el cual se localiza la ftalocianina en el medio biológico. Si bien, P₄ZnPc⁴⁺ produce eficientemente ¹O₂, en presencia de NADH también puede generar O₂^{•-}.

Aunque muchos otros factores pueden contribuir al daño fotoinducido en los sistemas celulares, la unión del sensibilizador a las células *C. albicans* aparentemente es necesaria para ejercer un efecto fotocitotóxico eficiente. En particular, P₄ZnPc⁴⁺ se encuentra unida fuertemente a las células de *C. albicans* mostrando un valor de $\sim 4 \text{ nmol}/10^6 \text{ UFC}$. Los estudios *in vitro* muestran que la PDI de las suspensiones en PBS de las células *C. albicans* tratadas con 5 μM del sensibilizador producen una fotoinactivación del >99,99% para P₄ZnPc⁴⁺, mientras que el efecto es muy bajo para el fotosensibilizador neutro o monocatiónico. El fotodaño inducido por P₄ZnPc⁴⁺ fue también confirmado por estudios en el retardo del crecimiento, indicando una rápida inactivación de cultivos de *C. albicans*.

Por lo tanto, la presente investigación indica que la ftalocianina tetracatiónica P_4ZnPc^{4+} representa un fotosensibilizador interesante para ser aplicado en la PDI de *C. albicans* en suspensiones celulares.

5.3. Ftalocianinas tricatiónicas TN_3ZnPc^{3+} , AN_3ZnPc^{3+} y FN_3ZnPc^{3+}

Por último se sintetizaron nuevas ftalocianinas con simetría A_3B , con la finalidad de desarrollar agentes fototerapéuticos con mayor eficiencia para la fotoinactivación de levaduras. El diseño de la arquitectura del sensibilizador anfifílico requiere la formación de ftalocianinas con simetría A_3B que comprenden tres subunidades isoindol idénticas (A) y una diferente (B). Por este motivo, tres nuevas ftalocianinas tricatiónicas sustituidas fueron sintetizadas a partir de diferentes derivados de ftalonitrilo (Pn), mediante la reacción de expansión del anillo de SubNPc. Esta metodología permitió obtener ftalocianinas con simetría A_3B sustituidas por tres grupos nitro en la periferia del macrociclo.

La síntesis de AN_3ZnPc^{3+} , fue realizada empleando un procedimiento de dos etapas. Primero, el derivado de ftalonitrilo conteniendo una estructura de adamantano fue preparado mediante la reacción de sustitución nucleofílica aromática. Por otro lado, la síntesis de la trinitrosubftalocianina SubNPc fue obtenida mediante la condensación del 4-nitroftalonitrilo con BCl_3 en xilenos. Posteriormente, el derivado de ftalonitrilo APn fue utilizado para expandir el anillo de la SubNPc. La reducción de los grupos nitro a amino con Na_2S , seguido por la metilación exhaustiva con yoduro de metilo fue utilizado para generar grupos catiónicos. La síntesis de TN_3ZnPc^{3+} fue realizada de manera similar, por medio de la expansión el anillo de la SubNPc con un derivado de ftalonitrilo sustituido con una unidad de naftaleno (TPn). Finalmente, FN_3ZnPc^{3+} fue obtenida mediante la expansión el anillo de la SubNPc con el derivado tetrafluorftalonitrilo (FPn).

Los estudios espectroscópicos de absorción en DMF muestran la banda Q ($\epsilon > 10^5 M^{-1} cm^{-1}$) a $\lambda_{max}=705$ nm para AN_3ZnPc^{3+} , $\lambda_{max}=686$ nm para TN_3ZnPc^{3+} y a $\lambda_{max}=675$ nm para FN_3ZnPc^{3+} . Estos derivados de ftalocianina presentan rendimientos cuánticos de fluorescencia de $\sim 0,2$ y una elevada producción de 1O_2 en DMF ($\Phi_{\Delta} \sim 0,6$).

Los estudios *in vitro* muestran que la PDI de las suspensiones en PBS de las células tratadas con 1 μM del sensibilizador producen una fotoinactivación del $>99.9\%$ para FN_3ZnPc^{3+} , mientras que el efecto es muy bajo para los fotosensibilizadores AN_3ZnPc^{3+} y

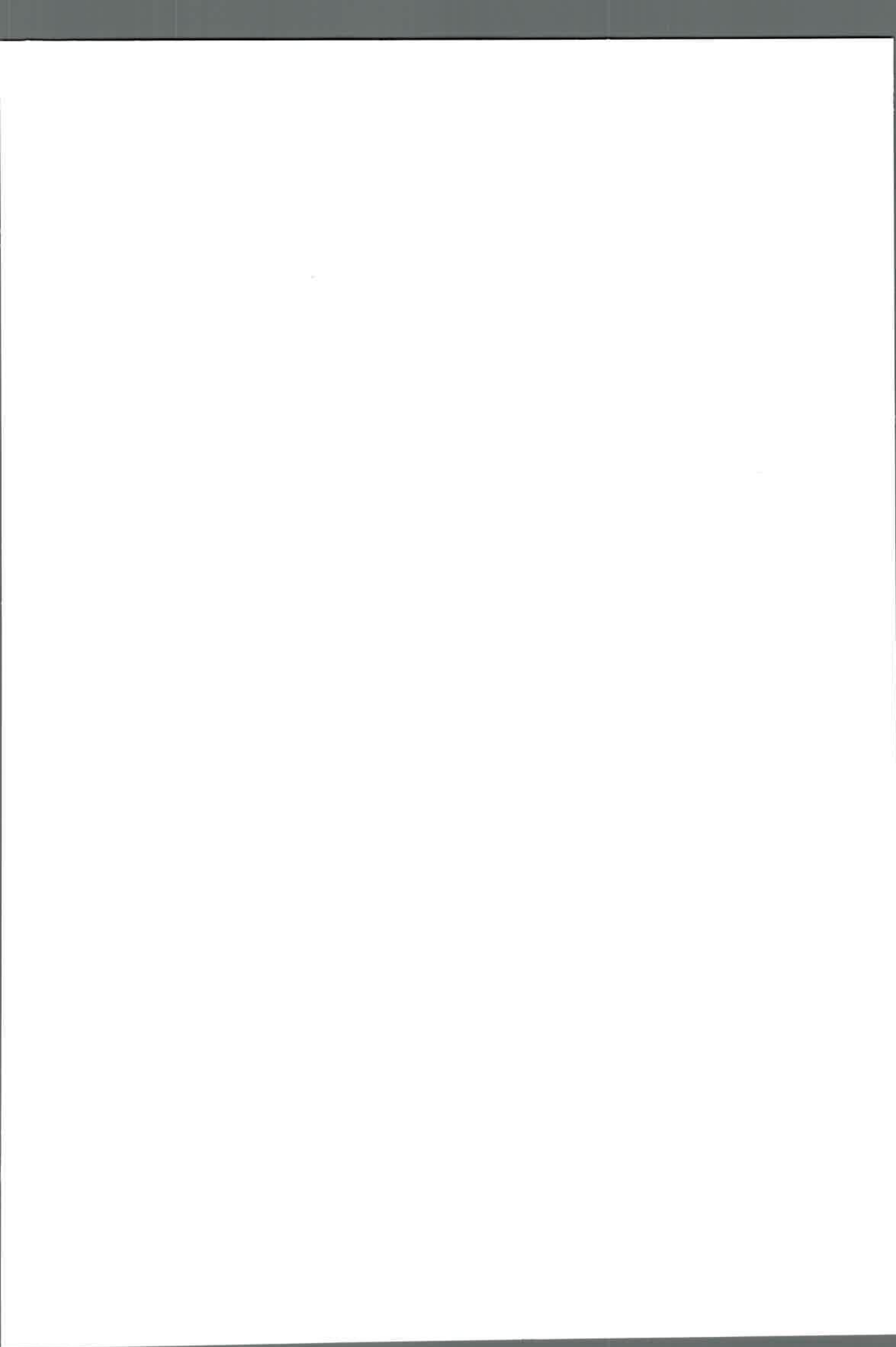
TN₃ZnPc³⁺. La ftalocianina FN₃ZnPc³⁺ se encuentra unida fuertemente a las células de *C. albicans*. El fotodaño inducido por FN₃ZnPc³⁺ fue también confirmado por estudios en el retardo del crecimiento, indicando una rápida inactivación de cultivos de *C. albicans*.

Los ensayos realizados indican que, en particular, la ftalocianina tricatiónica FN₃ZnPc³⁺ es un interesante agente para ser aplicado en PDT de *C. albicans*.

Por otro lado, cuando se emplearon glóbulos rojos como modelo celular para tratamientos de PDT, el fotosensibilizador AN₃ZnPc³⁺ fue el más activo para producir la hemólisis. Con 15 min de irradiación con luz visible y 10 μM de sensibilizador, AN₃ZnPc³⁺ produce un 88% de ruptura hemolítica. Este efecto es superior al producido por FN₃ZnPc³⁺, mientras que la actividad fotodinámica de TN₃ZnPc³⁺ fue considerablemente menor.

Los estudios obtenidos en el presente trabajo muestran que el derivado de ftalocianina AN₃ZnPc³⁺ sustituido en la periferia por un grupo adamantano presenta aplicaciones potenciales como agente fotosensibilizador para el tratamiento de PDT.

6. GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS



6. Glosario de abreviaturas y símbolos

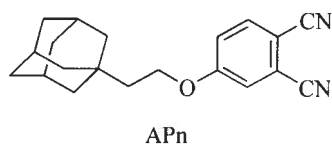
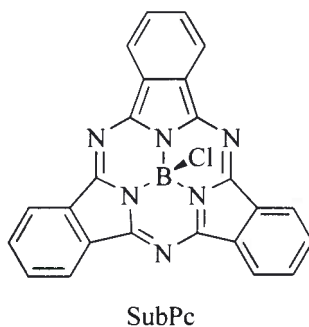
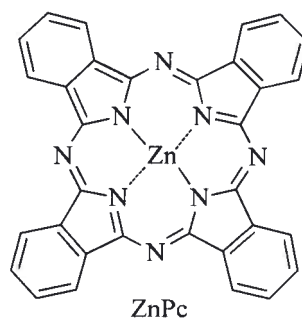
A	absorbancia
A _b	absorbancia del blanco
A _{hem}	absorbancia del ensayo a determinar el porcentaje de hemólisis
A _{100%}	absorbancia del ensayo lisado para obtener 100% de hemólisis
ADN	ácido desoxirribonucleico
AOT	sulfosuccinato de sodio
BioH	sustrato
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DMA	9,10-dimetilantraceno
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
F	fluorescencia
¹ HNMR	resonancia magnética nuclear de proton ¹ H
IC	decaimiento térmico
ICS	entrecruzamiento de sistema
k _{obs}	constante de velocidad observada

MS	espectrometría de masa
NBT	azul de nitro-tetrazolio
$^1\text{O}_2$	oxígeno molecular singlete
$^3\text{O}_2$	oxígeno molecular triplete
P	fosforescencia
PBS	solución amortiguadora de fosfato salino
PDT	terapia fotodinámica
PDI	inactivación fotodinámica
ROS	especies reactivas del oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
$^1\text{Sens}^*$	sensibilizador en estado excitado singlete
$^0\text{Sens}$	sensibilizador en estado basal
$^3\text{Sens}^*$	sensibilizador en estado excitado triplete
THF	tetrahidrofurano
UFC	unidades formadoras de colonias
λ	longitud de onda
λ_{em}	longitud de onda de emisión de fluorescencia

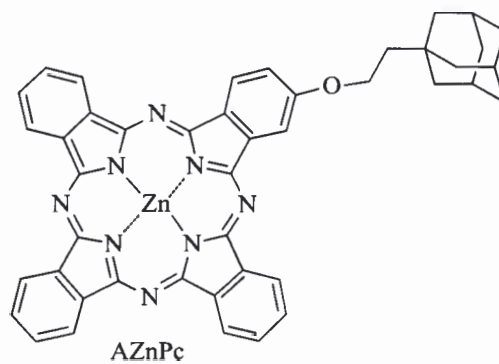
λ_{exc}	longitud de onda de excitación de fluorescencia
λ_{irr}	longitud de onda de irradiación
λ_{max}	longitud de onda de un máximo de absorción
Φ_{F}	rendimiento cuántico de fluorescencia
Φ_{Δ}	rendimiento cuántico de oxígeno singlete
τ_{T}	tiempo de vida del estado triplete

6. GLOSARIO DE MOLÉCULAS

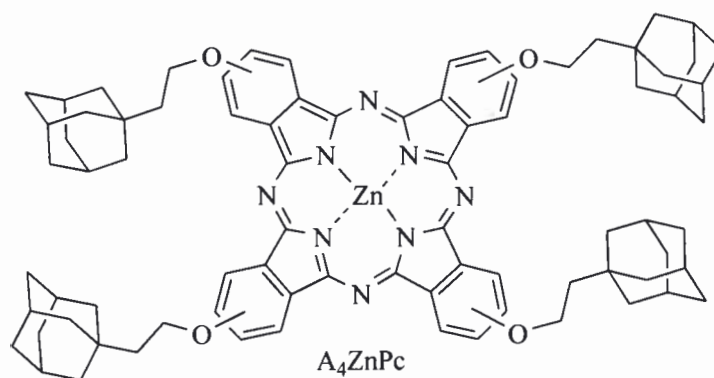
7. Glosario de moléculas

4-[2-(1-Adamantanil)etoxi]ftalonitrilo (APn)*Cloro subftalocianinato de boro(III) (SubPc)**Zinc(II)ftalocianina (ZnPc)*

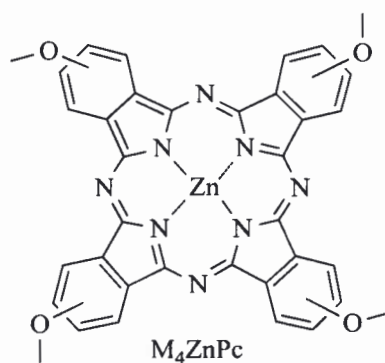
Zinc(II) 2-[2-(1-adamantil)etoxi]ftalocianina (AZnPc)

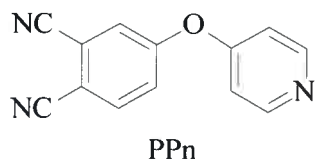
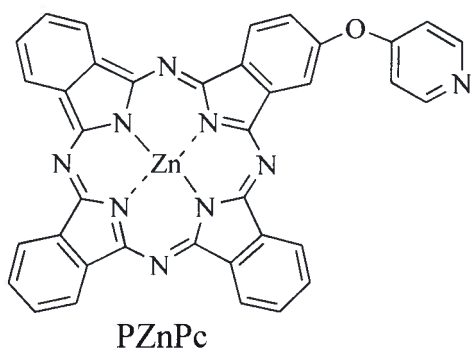
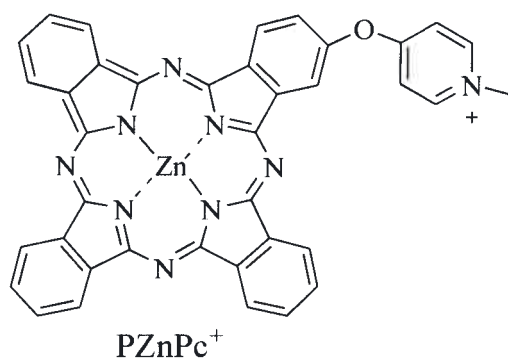


Zinc(II) 2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis[2-(1-adamantil)etoxi]ftalocianina (A₄ZnPc)

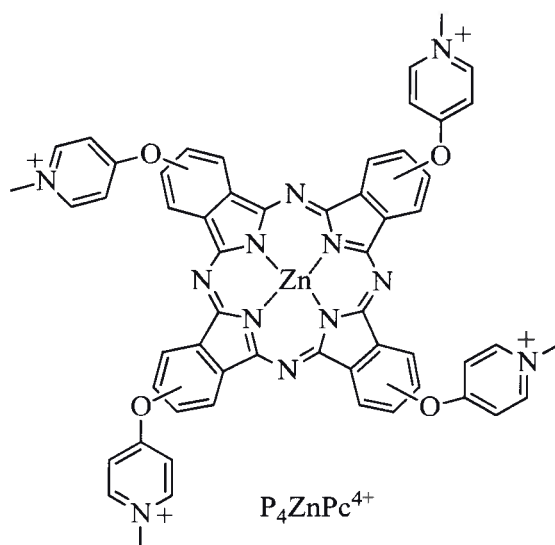


Zinc(II)2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis[metoxi]ftalocianina (M₄ZnPc)

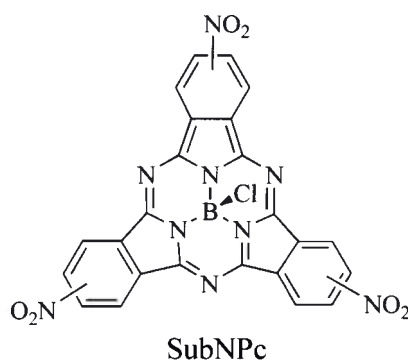


4-[4-Piridiloxi]ftalonitrilo (PPn)*Zinc(II)2-[4-piridiloxi]ftalocianina (PZnPc)**Zinc(II)2-[4-(N-metilpiridiloxi)ftalocianina (PZnPc⁺)*

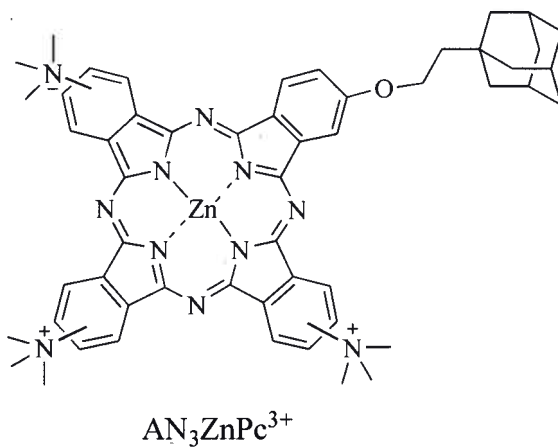
Zinc(II) 2,9,16,23-tetrakis [4-(*N*-metilpiridiloxi)]ftalocianina (P_4ZnPc^{4+})

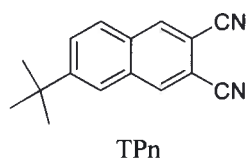
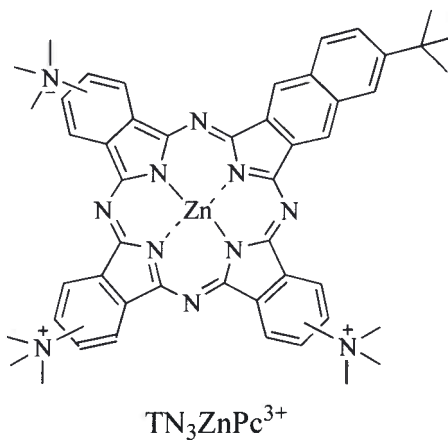
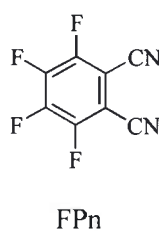
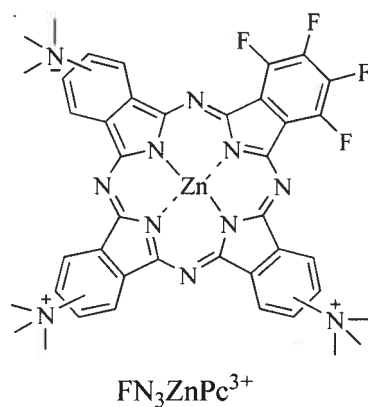


Cloro [2,9,16(17)-trinitrosubftalocianinato] boro(III) (*SubNPc*)

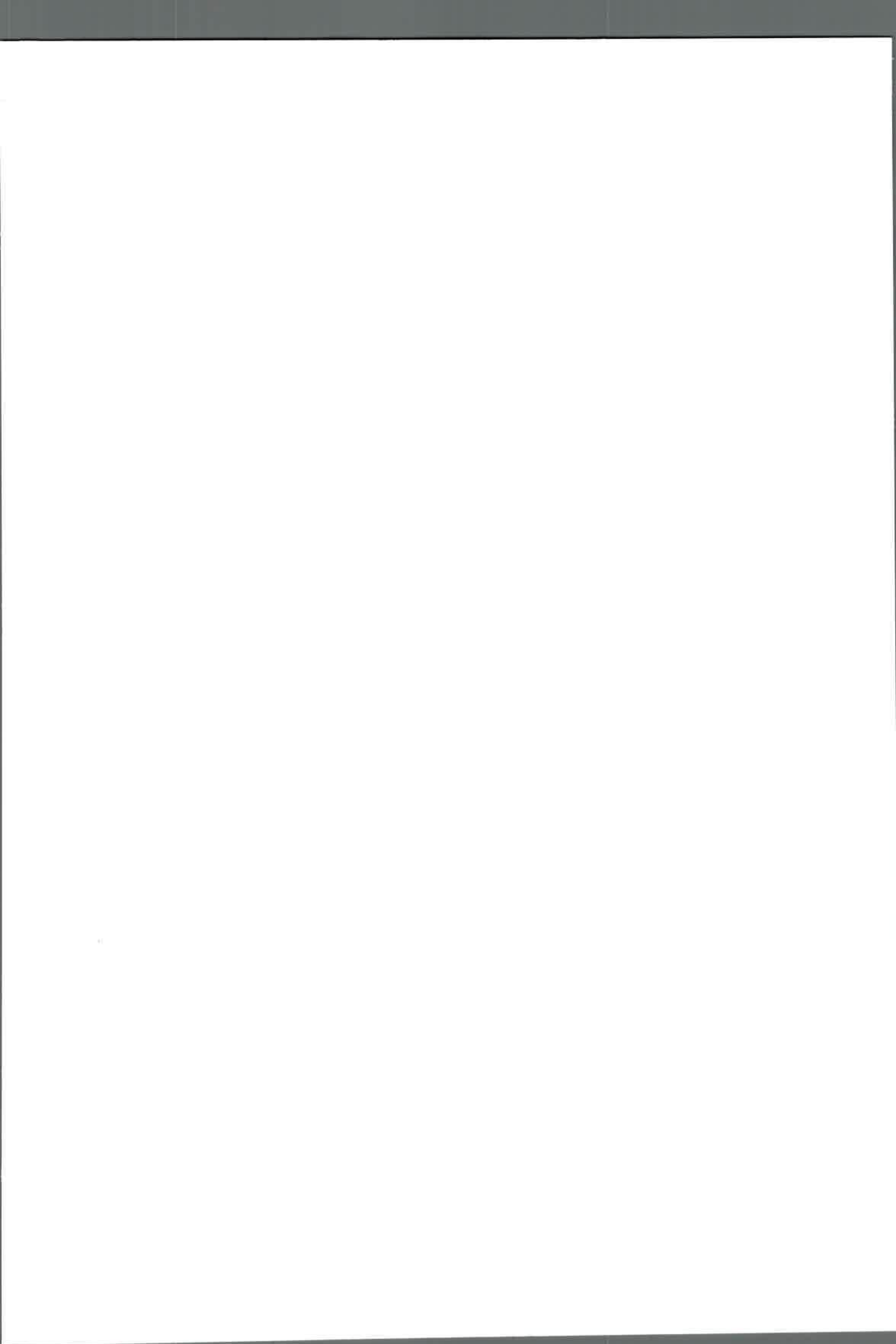


Zinc (II) 2-[2-(1-adamantil)etoksi]-9(10),16(17),23(24)-tris(*N,N,N*-trimetilamonio)ftalocianina (AN_3ZnPc^{3+})



5-terbutil-1,2-naftalenftalonitrilo (TPn)*Zinc(II) 2,3-[2'-tert-butil-1',3'-butadienil]-9(10),16(17),23(24)-tris(N,N,N-trimetilamonio) ftalocianina (TN₃ZnPc⁺³)**Tetrafluorftalonitrilo (FPn)**Zinc(II) 1,2,3,4-[tetrafluoro]-9(10),16(17),23(24)-tris(N,N,N-trimetilamonio)ftalocianina (FN₃ZnPc⁺³)*

8. REFERENCIAS



8. Referencias

- [1] Bonnett, R. Chemical aspect of photodynamic therapy. Gordon and Breach Science Publishers, Amsterdam, 2000.
- [2] Arad, O., Gavaldá, A., Rey, O., Rubio, N., Sánchez-García, D., Borrell, J., Teixidó, J., Nonell, S., Cañete, M., Juarranz, A., Villanueva, A., Stockert, J., Díaz Jiménez, P. Porfíricos para la fotoquimioterapia del cáncer y otras aplicaciones biomédicas. *Afinidad*, **59**, 2002.
- [3] Spikes, J. D. Historical review – Photodynamic Action from *Paramecium* to Photochemotherapy. *Photochem. Photobiol.*, **65**, 142-147, 1997.
- [4] Allison R. R., Sibata C. H., Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **7**, 61-75, 2010.
- [5] Von Tappeiner, H. Über die Wirkung Fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Rabb. *Muench. Med. Wochenschr.*, **47**, 5-7, 1900.
- [6] Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N., Reed, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, **74**, 656-669, 2001.
- [7] Meyer-Betz F. Untersuchungen über die Biologische (photodynamische) Wirkung des hamatoporphyrins und anderer Derivate des Blut-und Gallenfarbstoffs. *Disch. Arch. Klin. Med.*, **112**, 476-503, 1913.
- [8] Maisch, T., Szeimies, R-M., Jori, G., Abels, C. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **3**, 907-917, 2004.
- [9] O'Riordan, K., Akilov, O. E., Hasan, T. The potencial for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **2**, 247-262, 2005.
- [10] Dougherty, T. J. Photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, **58**, 895-900, 1993.
- [11] McCaughan, J. S. Jr. Photodynamic therapy. A review. *Drugs & Aging*, **15**, 49-68, 1999.
- [12] Grossweiner, L. I. The science of phototherapy, Chap. 8. In: Photodynamic therapy. CRC Press. pp 139-155. London, 1994.
- [13] Villanueva, A., Vidania, R., Stockert, J. C., Cañete, M., Juarranz, A. Photodynamic effects on cultured tumor cells. Cytoskeleton alterations and cell death mechanisms, Chap. 3. In: H. S. Nalwa Ed, Handbook of Photochemistry and Photobiology, vol. 4 Photobiology. American Scientific Publishers. pp 79-117. Valencia, 2002.
- [14] Henderson, B. W., Dougherty, T. J. How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.*, **55**, 145-157, 1992.

- [15] Penning, L. C., Dubbelman, T. M. Fundamentals of photodynamic therapy: cellular and biochemical aspects. *Anti-Cancer Drugs*, **5**, 139-146, 1994.
- [16] Ochsner, M. Photophysical and photobiological processes in photodynamic therapy of tumours. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **39**, 1-18, 1997.
- [17] Star, W. M., Marijnissen, H. P. C., Berg-Blok, A. E., Versteeg, J. A. C., Franken, K. A. P., Reinhold, H. S. Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative observed *in vivo* in sandwich observation chambers. *Cancer Res.*, **46**, 2532-2540, 1986.
- [18] Moan, J., Peng, Q., Sorensen, R., Iani V., Nesland J. M. The biophysical foundations of photodynamic therapy. *Endoscopy*, **30**, 387-391, 1998.
- [19] Kübler, A. C. Photodynamic therapy. *Med. Laser Appl.*, **20**, 37-45, 2005.
- [20] Jochan, D. Clinical experiences and expectations, Chap. 3.8. In: Moser, J. G., Ed, Photodynamic tumor therapy, 2nd and 3rd generation photosensitizers. Harwood Academic Publishers. pp 213-226. Amsterdam, 1998.
- [21] Wan, S., Parrish, J. A., Anderson, R. R., Medden, M. Transmittance of nonionizing radiation in human tissue. *Photochem. Photobiol.*, **34**, 979-684, 1981.
- [22] Rebeiz, C. A., Montazer-Zouhoor, A., Hopen, H. J., Wu, S. M. Photodynamic herbicides: 1. Concept and phenomenology. *Enzyme Microb. Tech.*, **6**, 390-396, 1984.
- [23] Nandihalli, U. B., Rebeiz, C. A. Photodynamic herbicides. 9. Structure activity study of substituted 1,10-phenanthrolines as potent photodynamic herbicide modulators. *Pestic. Biochem. Phys.*, **40**, 27-46, 1991.
- [24] Rebeiz, C. A., Juvik, J. A., Rebeiz, C. C. Porphyrin insecticides: 1. Concept and phenomenology. *Pestic. Biochem. Phys.*, **30**, 11-27, 1988.
- [25] Ben Amor, T., Jori, G. Sunlight-activated insecticides: historical background and mechanisms of phototoxic activity. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **30**, 915-925, 2000.
- [26] Wainwright, M. Local treatment of viral disease using photodynamic therapy. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **21**, 510-520, 2003.
- [27] Wainwright, M. Photoinactivation of viruses. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **5**, 406-411, 2004.
- [28] Jori, G., Brown, S. B. Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **3**, 403-405, 2004.
- [29] DeRosa, M. C., Crutchley, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord. Chem. Rev.*, **233-234**, 351-371, 2002.

- [30] Wainwright, M., Crossley, K. B. Photosensitising agents-circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. *Int. Biodeter. Biodegrad.*, **53**, 119-126, 2004.
- [31] Jori, G., Schindl, L., Schindl, A., Polo, L. Novel approaches towards a detailed control of the mechanism and efficiency of photosensitized process *in vivo*. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **102**, 101-107, 1996.
- [32] Röeder, B. Photobiophysical parameters, Chap. 1.2. In: Moser, J. G., Ed, Photodynamic tumor therapy, 2nd and 3rd generation photosensitizers. Harwood Academic Publishers. pp 9-20. Amsterdam, 1998.
- [33] Maclean, M., MacGregor, S. J., Anderson, J. G., Woolsey, G. A. The role of oxygen in the visible-light inactivation of *Staphylococcus aureus*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **92**, 180-184, 2008.
- [34] Dubbelman, T. M. A. R., Steveninck, J. Photodynamically induced damage to cellular functions and its relation to cell death. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **6**, 345-347, 1990.
- [35] Stockert, J. C., Juarranz, A., Villanueva, A., Nonell, S., Horobin, R. W., Soltermann, A. T., Durantini, E. N., Rivarola, V., Colombo, L. L., Espada, J., Cañete, M. Photodynamic therapy: selective uptake of photosensitizing drugs into tumor cells. *Curr. Topics Pharmacol.*, **8**, 185-217, 2004.
- [36] Moan, J. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **6**, 343-344, 1990.
- [37] Ogilby P. R. Singlet oxygen: there is still something new under the sun, and it is better than ever. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **9**, 1543-1560, 2010.
- [38] Langlois, R., Ali, H., Brasseur, N., Wagner, J. R., van Lier, J. E. Biological activities of phthalocyanines-IV. Type II sensitized photooxidation of L-tryptophan and cholesterol by sulfonated metallo phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.*, **44**, 117-123, 1986.
- [39] Geiger, P. G., Korytowski, W., Lin, F., Girotti, A. W. Lipid peroxidation in photodynamically stressed mammalian cells: use of cholesterol hydroperoxides as mechanistic reporters. *Free Radical Biol. Med.*, **23**, 57-68, 1997.
- [40] Nakae, Y., Fukusaki, E., Kajiyama, S., Kobayashi, A., Sakata, I. Convenient screening methods for the photosensitivity. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **171**, 95-99, 2004.
- [41] Stratton, S. P., Liebler, D. C. Determination of singlet oxygen-specific *versus* radical-mediated lipid peroxidation in photosensitized oxidation of lipid bilayers: effect of β -carotene and α -tocopherol. *Biochem.*, **36**, 12911-12920, 1997.

- [42] Girotti, A. W. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **63**, 103-113, 2001.
- [43] Kriska, T., Korytowski, W., Girotti, A. W. Hyperresistance to photosensitized lipid peroxidation and apoptotic killing in 5-aminolevulinic acid-treated tumor cells over expressing mitochondrial GPX4. *Free Radical Biol. Med.*, **33**, 1389-1402, 2002.
- [44] Sakharov, D. V., Elstak, E. D. R., Chernyak, B., Wirtz, K. W. A. Prolonged lipid oxidation after photodynamic treatment. Study with oxidation-sensitive probe C11-BODIPY581/591. *FEBS Letters*, **579**, 1255-1260, 2005.
- [45] Ferraudi, G., Argüello, G. A., Ali, H., van Lier, J. E. Types I and II sensitized photooxidation of amino acid by phthalocyanines: a flash photochemical study. *Photochem. Photobiol.*, **47**, 657-660, 1988.
- [46] Wessels, J. M., Foote, C. S., Ford, W. E., Rodgers, M. A. J. Photooxidation of tryptophan: $O_2(^1\Delta_g)$ versus electron-transfer pathway. *Photochem. Photobiol.*, **65**, 96-102, 1997.
- [47] Milanesio, M. E., Alvarez, M. G., Yslas, E. I., Borsarelli, C. D., Silber, J. J., Rivarola, V., Durantini, E. N. Photodynamic studies of metallo 5,10,15,20-tetrakis(4-methoxyphenyl)porphyrin: photochemical characterization and biological consequences in a human carcinoma cell line. *Photochem. Photobiol.*, **74**, 14-21, 2001.
- [48] Milanesio, M. E., Alvarez, M. G., Silber, J. J., Rivarola, V., Durantini, E. N. Photodynamic activity of monocationic and non-charged methoxyphenylporphyrin derivatives in homogeneous and biological media. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2**, 926-933, 2003.
- [49] Ravanat, J-L., Berger, M., Benard, F., Langlois, R., Oullet, R., van Lier, J. E., Cadet, J. Phthalocyanine and naphthalocyanine photosensitized oxidation of 2'-deoxyguanosine: distinct type I and type II products. *Photochem. Photobiol.*, **55**, 809-814, 1992.
- [50] Sheu, C., Foote, C. S. Endoperoxide formation in a guanosine derivative, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 10446-10447, 1993.
- [51] Ravanat, J-L., Cadet, J., Araki, K., Toma, H. E., Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P. Supramolecular cationic tetra-ruthenated porphyrin and light-induced decomposition of 2'-deoxyguanosine predominantly via a singlet oxygen-mediated mechanism. *Photochem. Photobiol.*, **68**, 698-702, 1998.

- [52] Kubát, P., Lang, K., Anzenbacher, Jr. P., Jursíková, K., Král, V., Ehrenberg, B. Interaction of novel cationic *meso*-tetraphenylporphyrins in the ground and excited states with DNA and nucleotides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1**, 933-941, 2000.
- [53] Mettath, S., Munson, B. R., Pandey, R. K. DNA interaction and photocleavage properties of porphyrins containing cationic substituents at the peripheral position. *Bioconjugate Chem.*, **10**, 94-102, 1999.
- [54] Ali, H., van Lier, J. E. Metal complexes as photo- and radiosensitizers, *Chem. Rev.*, **99**, 2379-2450, 1999.
- [55] Boyle, R. W., Dolphin, D. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. *Photochem. Photobiol.*, **64**, 469-485, 1996.
- [56] Lang, K., Mosinger, J., Wagnerová, D. M. Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy. *Coordination Chem. Rev.*, **248**, 321-350, 2004.
- [57] Sharman, W. M., van Lier, J. E., Allen, C. M. Targeted photodynamic therapy *via* receptor mediated delivery systems. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **56**, 53-76, 2004.
- [58] Braun, A., Tcherniac, J. Über die produkte der einwirkung von acetanhydrid auf phthalimid. *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **40**, 2709-2714, 1907.
- [59] Nyokong, T. Effects of substituents on the photochemical and photophysical properties of main group metal phthalocyanines. *Coord. Chem. Rev.*, **251**, 1707-1722, 2007.
- [60] Linstead, R. P. Byrne, G. T.; Lowe, A.R. Phthalocyanines. Part I. A new type of synthetic colouring matters *J. Chem. Soc.*, 1016-1017, 1934.
- [61] Dent, C. E.; Linstead, R. P. Phthalocyanines. Part IV. Copper phthalocyanines. *J. Chem. Soc.*, 1027-1031, 1934.
- [62] Yang, C. H., Lin, S. F., Chen, H. L., Chang C. T. Electrosynthesis of the metal phthalocyanine complexes. *Inorg. Chem.*, **19**, 3541-3543, 1980.
- [63] Kharisov, B. I., Garza Rodríguez, L. A., Blanco, L. M., Méndez Rojas, M. A. Técnicas para la preparación de ftalocianinas. *Ingenierías*, **7**, No 22, 71-84, 2004.
- [64] Cosimelli, B., Roncucci, G., Dei, D., Fantetti, L., Ferroni, F., Rici, M., Spinelli, D. Synthesis and antimycotic activity of new unsymmetrical substituted zinc phthalocyanines. *Tetrahedron*, **59**, 10025-10030, 2003.

- [65] Yslas, E. I., Rivarola, V., Durantini, E. N. Synthesis and photodynamic activity of zinc(II) phthalocyanine derivatives bearing methoxy and trifluoromethylbenzyloxy substituents in homogeneous and biological media. *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 39-46, 2005.
- [66] Wang, A., Long, L., Zhang, C. Synthesis of unsymmetrical phthalocyanines: a brief overview. *Tetrahedron*, **68**, 2433-2451, 2012.
- [67] Rodríguez-Morgade M. S., de la Torre G., Torres T. Design and synthesis of low-symmetry phthalocyanines and related systems. In: Kadish KM, Smith KM, Guillard R., editors. Phthalocyanines: synthesis, The porphyrin handbook. Academic Press. p. 125-160. San Diego, 2003.
- [68] Lo, PC., Zhao, B., Duan, W., Duan, L., Fong, WP., Ko, WH., Ng, DK. Synthesis and in vitro photodynamic activity of mono-substituted amphiphilic zinc(II) phthalocyanines. *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 1073-1077, 2007.
- [69] Duan, W., Lo, PC., Duan, L., Fong, WP., Ng, DK. Preparation and in vitro photodynamic activity of amphiphilic zinc(II) phthalocyanines substituted with 2-(dimethylamino)ethylthio moieties and their N-alkylated derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 2672-2677, 2010.
- [70] Kobayashi N, Kondo R, Nakajima S, Osa T. New route to unsymmetrical phthalocyanine analogues by the use of structurally distorted subphthalocyanines. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 9640-9641, 1990.
- [71] Ali, H., Sim, SK., van Lier, JE. Synthesis of unsymmetrical phthalocyanines. *J. Chem. Res.* (S), 496-497, 1999.
- [72] Claessens, C.G., González-Rodríguez, D., Torres, T. Subphthalocyanines: singular nonplanar aromatic compounds-Synthesis, reactivity, and physical properties. *Chem. Rev.*, **102**, 835-853, 2002.
- [73] Del Rey, B., Keller, U., Torres, T., Rojo, G., Agulló-López, F., Nonell, S., Martí, C. Brasselet, S., Ledoux, I., Zyss, J. Synthesis and nonlinear optical, photophysical, and electrochemical properties of subphthalocyanines. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 12808-12817, 1998.
- [74] Ohno-Okumura, E., Sakamoto, K., Kato, T., Hatano, T., Fukui, K., Karatsu, T., Kitamura, A., Urano, T. Synthesis of subphthalocyanine derivatives and their characterization. *Dyes and Pigments*, **53**, 57-65, 2002.
- [75] Spesia, M., Durantini, E. Synthesis and antibacterial photosensitizing properties of a novel tricationic subphthalocyanine derivative. *Dyes Pigments*, **77**, 229-237, 2008.

- [76] Chauhan, S.M.S., Pratibha Kumari. Synthesis of unsymmetrical benzoporphyrazines in functional ionic liquids and formation of self-aggregates of zinc(II) pyridino[3,4]tribenzoporphyrazines in solutions. *Tetrahedron*, **65**, 2518-2524, 2009.
- [77] 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*, **91**, 6-12, 2011.
- [78] Zhang, X.-F., Xu, H.-J. Influence of halogenation and aggregation on photosensitizing properties of zinc phthalocyanine. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **89** (18): 3347-3351, 1993.
- [79] Tabata K., Fukushima K., Oda K., Okura I. Selective aggregation of zinc phthalocyanines in the skin. *J. Porphyrins Phthalocyan.* **4**, 278-284, 2000.
- [80] 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, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2** (2), 145-158, 1998.
- [81] Maree D., Nyokong T., Suhling K., Philips D. Effects of axial ligands on the photophysical properties of silicon octaphenoxy phthalocyanine. *J. Porphyrins Phthalocyan.*, **6**, 373-376, 2002.
- [82] Maree S., Phillips D., Nyokong T. Synthesis, Photophysical and photochemical studies of germanium and tin phthalocyanine complexes *J. Porphyrins Phthalocyan.* **6**, 17-25, 2002.
- [83] Dupouy, E. A., Lazzeri, D., Durantini, E. N. Photodynamic activity of cationic and non-charged Zn(II)tetrapyrroline derivatives: biological consequences in human erythrocytes and *Escherichia coli*. *Photochem. Photobiol. Sci.* **3**, 992-998, 2004.
- [84] Moser, J. G. Photodynamic Tumor Therapy, 2nd and 3^{er} Generation Photosensitizers, Harwood academic publishers. Amsterdam, 1998.
- [85] Marti, C., Nonell, S., Nicolau, M., Torres, T. Photophysical properties of neutral and cationic tetrapyrroline derivatives. *Photochem. Photobiol.*, **71**, 53-59, 2000.
- [86] Scalise, I., Durantini, E. N. Synthesis, properties, and photodynamic inactivation of *Escherichia coli* using a cationic and noncharged Zn(II) pyridyloxyphthalocyanine derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 3037-3045, 2005.
- [87] Berg, K., Bomme, J.C., Moan, J. Evaluation of sulfonated aluminium phthalocyanines for use in photochemotherapy. A study on the relative efficiencies of photoinactivation. *Photochem. Photobiol.*, **49**, 587-594, 1988.

- [88] Kostka, M., Zimcik, P., Miletin, M., Klemra, P., Kopecky, K., Musil, Z. Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **178**, 16-25, 2006.
- [89] Suchetti, C. A., Durantini, E. N. Monomerization and photodynamic activity of Zn(II) tetraalkyltetrapyrridino porphyrinium derivatives in AOT reverse micelles, *Dyes Pigm.*, **74**, 630-635, 2007.
- [90] Cormick, M. P., Rovera, M., Durantini, E. N. Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of a novel Zn(II) phthalocyanine substituted by fluconazole groups. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **194**, 220-229, 2008.
- [91] Shears, P., Resistance as a worldwide problem. In *Bacterial Resistance to Antimicrobials, Second Edition*, Wax, R. G., Lewis, K., Salyers, A., Taber, H. Eds., Marcel Dekker, CRC Press, Taylor & Francis Group. pp. 363–376. Boca Raton, 2007.
- [92] Tianhong D., Ying-Ying Huang, Hamblin M. R. Photodynamic therapy for localize infections- State of the art. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **6**, 170-188, 2009.
- [93] Yoshikawa T. T., Antimicrobial resistance and aging: beginning of the end of antibiotic era?, *J. Am. Geriatr. Soc.*, **50**, S226-S229, 2002.
- [94] Vaira, D. et al. 2002 *Helicobacter pylori* infection from pathogenesis to treatment – a critical appraisal. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **16**, 105–113, 2002.
- [95] Kerr, K.G., Lacey, R.W., Why do we still get epidemics? In *Fifty Years of Antimicrobials: Past Perspectives and Future Trends*. Hunter, P.A. et al., eds., Cambridge University Press, pp. 179-203, 1995.
- [96] British National Formulary 44, British Medical Association and the Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, 258–329, 2002.
- [97] Durantini, E. N. Photodynamic inactivation of bacteria. *Current Bioactive Compound*, **2**, 127-142, 2006.
- [98] Maisch, T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Laser Med. Sci.* **22**, 83-91, 2007.
- [99] Hamblin, M. R., Hasan, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem. Photobiol. Sci.*, **3**, 436-450, 2004.
- [100] Taylor, P. W., Stapleton, P. D., Luzio, J. P. New ways to treat bacterial infections. *Drug Discovery Today*, **7**, 1086-1091, 2002.

- [101] Merchat, M., Bertolini, G., Giacomini, P., Villanueva, A., Jori, G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of Gram-positive and Gram-negative bacterias. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **32**, 153-157, 1996.
- [102] Merchat, M., Spikes, J. D., Bertolini, G., Jori, G. Studies on the mechanisms of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **35**, 149-157, 1996.
- [103] Nitzan, Y., Asquenazi, H. Photoinactivation of *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli* B by a Cationic Hydrophilic Porphyrin at Various Light Wavelengths. *Current Microbiology*, **42**, 408, 2001.
- [104] Hancock, R. E. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbiol.*, **5**, 37, 1997.
- [105] Lambrechts, S. A. G., Aalders, M. C. G., Van Marle J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *J. Antimicrobial agents and chemotherapy.*, **49**, 2026–2034, 2005.
- [106] Pontón, J. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina *Rev Iberoam Micol.*, **25**, 78-82, 2008.
- [107] Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., Brock Biology of Microorganisms, Pearson Education. New Jersey, 2003.
- [108] Samson, J., Candidiosis bucales: Epidémiologie, diagnostic et traitement. *Rev. Mens. Suisse Odontostomatol.*, **100**, 548-559, 1990.
- [109] Webb, B. C., Thomas, C. J., Willcox, M. D. P., Harry, D. W. S., Knox, K. W. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review. Part 2. Oral diseases caused by *Candida* species *Aust. Dent. J.*, **43**, 45-50, 1998.
- [110] Calderone R., Braun P. Adherence and Receptor Relationships of *Candida albicans* *Microbiol Rev.*, **55**, 1-20, 1991.
- [111] Solís Cuesta, F., Linares Sicilia, M. J., Casal Román, M., Moreno Giménez, J. C., Clasificación de las infecciones fúngicas. Características microbiológicas de interés clínico. Estudio de resistencia. Infecciones fúngicas superficiales. *Medicine*, **57**, 3683-3692, 2006.
- [112] Nolte, W. Microbiología Odontológica. 4 ed. Ed. Interamericana, 549-590. México, 1986.
- [113] Soysa, N. S., Samaranyake, L. P., Ellepola, A. N. B., Cytotoxic drugs, radiotherapy and oral candidiasis. *Oral Oncol.*, **40**, 971-978, 2004.

- [114] Brion, L. P., Uko, S. E., Goldman, D. L. Risk of resistance associated with fluconazole prophylaxis: Systematic review. *J. Infection*. **54**, 521-529, 2007.
- [115] Sábada, B., García-Quetglas, E., Azanza, J. R. Relación entre estructura y función en los azoles. *Rev. Esp. Quimioterap.*, **17**, N° 1, 71-78, 2004.
- [116] Tani, N., Rahnasto-Rilla, M., Wittekindt, C., Salminen, K. A., Ritvanen, A., Ollakka, R., Koskiranta, J., Raunio, H., Juvonen, R. O. Antifungal activities of novel non-azole molecules against *S. cerevisiae* and *C. albicans*. *Eur. J. Med. Chem.* **47**, 270-277, 2012.
- [117] Ribeiro, M. A., Rodrigues, C. P., Up-regulation of ERG11 gene among fluconazole-resistant *Candida albicans* generated in vitro: is there any clinical implication? *Diagn. Micr. Infec. Dis.* **57**, 71-75, 2007.
- [118] Ito, T. Photodynamic action of hematoporphyrin on yeast cells-a kinetic approach, *Photochem. Photobiol.*, **34**, 521-524, 1981.
- [119] Bertoloni, G., Zambotto, F., Conventi, L., Reddi, E., Jori, G. Role of specific cellular targets in the hematoporphyrin- sensitized photoinactivation of microbial cells, *Photochem. Photobiol.* **46**, 695-698, 1987.
- [120] Imray, F. P., MacPhee, D. G. The role of DNA polymerase I and the rec system in survival of bacteria and bacteriophages damaged by the photodynamic action of acridine orange. *Mol. Gen. Genet.*, **123**, 289-298, 1973.
- [121] Bertoloni, G., Lauro, F. M., Cortella, G., Merchat, M. Photosensitizing activity of hematoporphyrin on *Staphylococcus aureus* cells. *Biochim. Biophys.*, **1475**, 169-174, 2000.
- [122] Vaara, M., Vaara, T. Polycations as outer membrane disorganizing agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **24**, 114-122, 1983.
- [123] Valduga, G., Breda, B., Giacometti, G. M., Jori, G., Reddi, E. Photosensitization of wild and mutant strains of *Escherichia coli* by meso-tetra(N-methyl-4-pyridyl)porphine. *Biochem. Biophys.*, **256**, 84-88, 1999.
- [124] Joklik, W., Willett, H., Amos, B., Wilfert, C. Zinsser Microbiología 20ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, 1998.
- [125] Ganong, W. F. Fisiología Médica, 17^{ma} edición, traducida de la 19^{na} edición en inglés, Editorial El Manual Moderno. México, 2000.
- [126] Peng, Q., Moan, J., Kongshaug, M., Evensen, J. F., Anholt, H., Rimington, C. Sensitizer for photodynamic therapy of cancer: a comparison of the tissue distribution of Photofrin II and

- aluminum phthalocyanine tetrasulfonate in nude mice bearing a human malignant tumor. *Int. J. Cancer*, **48**, 258-264, 1991.
- [127] Dougherty, T. J., Gomer, C. J., Henderson, B. W., Jori, G., Kessel, D., Korblik, M., Moan, J., Peng, Q. Photodynamic therapy. *J. Nat. Cancer Inst.*, **90**, 889-905, 1998.
- [128] Zuk, M. M., Kenney, M. E., Horowitz, B., Ben-Hur, E. High-performance liquid chromatographic determination of silicon phthalocyanine Pc 4 in human blood. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.*, **673**, 320-324, 1995.
- [129] Kaestner, L. Evaluation of human erythrocytes as model cells in photodynamic therapy. *Gen Physiol. Biophys.*, **22**, 455-465, 2003.
- [130] Kaestner L., Juzeniene A., Moan J. Erythrocytes-the house elves of photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **3**, 981-989, 2004.
- [131] Smetana, Z., Mendelson, E., Manor, J., van Lier, J. E., Ben-Hur, E., Salzburg, S. Photodynamic inactivation of herpes viruses with phthalocyanines derivatives. *J. Photochem Photobiol. B*, **22**, 37-43, 1994.
- [132] Lang, K., Mosinger, J., Wagnerová, D. M. Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy. *Coordination Chem. Rev.*, **248**, 321-350, 2004.
- [133] Ochoa A. L., Tempesti T. C., Spesia M. B., Milanesio M. E., Durantini E. N. *Eur. J. med. Chem*, **50**, 280-287, 2012.
- [134] Claessens C. G., González-Rodríguez D., Del Rey B., Torres T., Gertraud M., Schuchmann H.-P., Von Sonntag C., MacDonald J.G., Nohr R. S., *Eur. J. Org. Chem.*, 2547-2551, 2003.
- [135] 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. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 2746-2747, 1996.
- [136] Spesia, M. B., Rovera, M., Pascual, L., Durantini, E. N. A new antibacterial approach using photodynamic inactivation. *Chem. Educator*, **10** (10), 1-4, 2005.
- [137] Schmidt, R., Afshari, E. Effect of solvents on the phosphorescence rate constant of singlet molecular oxygen ($^1\Delta_g$). *J. Phys. Chem.*, **94**, 4377-4378, 1990.
- [138] Redmond, R. W., Gamlin, J. N. A compilation of singlet yields from biologically relevant molecules. *Photochem. Photobiol.*, **70**, 391-475, 1999.
- [139] Seotsanyana-Mokhosi, I., Kuznetsova N., Nyokong, T. Photochemical of tetra-2,3-pyridinoporphyrazines. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **140**, 215-222, 2001.

- [140] Scalise I., Durantini, E. N. Photodynamic effect of metallo 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-tris(4-methylphenyl) porphyrins in biomimetic media, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **162**, 105-113, 2004.
- [141] Milanesio, M. E., Spesia, M. B., Cormick, M. P., Durantini, E. N. Mechanistic studies on the photodynamic effect induced by a dicationic fullerene C₆₀ derivative on *Escherichia coli* and *Candida albicans* cells. *Photodiag. Photodyn. Ther.* **10**, 320-327, 2013.
- [142] Juarranz, A., Villanueva, A., Díaz, V., Rodríguez-Borlado, L., Trigueros, C., Cañete, M. Induced photolysis of rabbit red blood cells by several photosensitizers. *Anti-Cancer Drugs*, **4**, 501-504, 1993.
- [143] Zarubaev, V.V., Golod, E.L., Anfimov, P.M., Shtro, A.A., Saraev, V.V., Gavrilov, A.S. Logvinov, A.V. Kiselev, O.I. Synthesis and anti-viral activity of azolo-adamantanes against influenza A virus. *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 839-848, 2010.
- [144] Kadi, A.A., Al-Abdullah, E.S., Shehata, I.A., Habib, E.E., Ibrahim, T.M., El-Emam, A.A. Síntesis, actividades antimicrobianas y anti-inflamatorios de la novela 5- (1-adamantil) derivados de 1,3,4-tiadiazol . *Eur. J. Med. Chem.*, **45**, 5006-5011, 2010.
- [145] Liu, J., Obando, D., Liao, V., Lifa, T., Codd, R. The many faces of the adamantyl group in drug design. *Eur. J. Med. Chem.*, **46**, 1949-1963, 2011.
- [146] Yslas, E. I., Durantini, E. N., Rivarola, V. A. Zinc (II) 2,9,16,23-tetrakis (methoxy) phthalocyanine: potential photosensitizer for use in photodynamic therapy in vitro. *Bioorg. Med. Chem.*, **15** (13), 4651-4660, 2007.
- [147] Ogunsipe, A., Maree, D., Nyokong, T. Solvent effects on the photochemical and fluorescence properties of zinc phthalocyanine derivatives. *J. Mol. Struct.* **650**, 131-140, 2003.
- [148] Borsarelli, C. D., Durantini, E. N., García, N. A. Singlet molecular oxygen-mediated photooxidation of nitrophenolic compounds in water-in-oil microemulsions. *J. Chem. Soc. Perkin Trans*, **2**, 2009-2013, 1996.
- [149] Aveline, B. M., Sattler, R. M., Redmond, R. W. Enviromental effects on cellular photosensitization: correlation of phototoxicity mechanism with transient absorption spectroscopy measurements. *Photochem. Photobiol.*, **68**, 51-62, 1998.
- [150] De, T. K., Maitra, A. Solution behavior of aerosol ot in nonpolar-solvents. *Adv. Colloid Interface Sci.*, **59**, 95-193, 1995.

- [151] Mora, S.J., Cormick, M.P., Milanesio, M.E., Durantini, E.N. The photodynamic activity of a novel porphyrin derivative bearing a fluconazole structure in different media and against *Candida albicans*. *Dyes Pigm.*, **87**, 234-240, 2010.
- [152] Rosenthal, I., Shafirovich, V. Y., Geacintov, N. E., Ben-Hur E., Horowitz, B. The photochemical properties of fluoroaluminum phthalocyanine. *Photochem. Photobiol.*, **60**, 215-220, 1994.
- [153] Khalili, M., Grossweiner, L. I. Sensitization of photohemolysis by benzoporphyrin derivative monoacid ring A and porphyrins, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **37**, 236-244, 1997.
- [154] Hoebeke, M., Schuitmaker, H. J., Jannink, L. E., Dubbelman, T. M. A. R., Jakobs A., Van de Vorst, A. Electron spin resonance evidence of the generation of superoxide anion, hydroxyl radical and singlet oxygen during the photohemolysis of human erythrocytes with bacteriochlorin a. *Photochem. Photobiol.*, **66**, 502-508, 1997.
- [155] Rovaldi, C. R., Pievsky, A., Sole, N. A., Friden, P. M., Rothstein, D. M., Spacciapoli, P. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 3364-3367, 2000.
- [156] Zavodnik, I. B., Zavodnik, L. B., Bryszewska, M. J. The mechanism of Zn-phthalocyanine photosensitized lysis of human erythrocytes. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **67**, 1-10, 2002.
- [157] Williamson, L. M., Cardigan, R., Prowse, C. V. Methylene blue-treated fresh-frozen plasma: what is its contribution to blood safety? *Transfusion*, **43**, 1322-1329, 2003.
- [158] Depasse, F., Sensebé, L., Seghatchian, J., Andreu, G., Samana, M. The influence of methylene blue light treatment and methylene blue removal filter on fibrinogen activity states and fibrin polymerisation indices. *Transfusion and Apheresis Science*, **33**, 63-69, 2005.
- [159] Chan, W-S., Zuk, M., Ben-Hur, E. Phthalocyanines, Chap. 2.4, in *Photodynamic tumor therapy, 2nd and 3rd generation photosensitizers*, ed. Moser, J. G. Harwood Academic Publishers. pp. 63-73. Amsterdam, 1998.
- [160] Wainwright, M. The emerging chemistry of blood product disinfection. *Chem. Soc. Rev.*, **31**, 128-136, 2002.
- [161] Suwalsky, M., Orellana, P., Avello, M., Villena, F. Protective effect of *Ugni molinae* Turcz against oxidative damage of human erythrocytes. *Food Chem. Toxicol.*, **45** 130-135, 2007.

- [162] Ergaieg, K., Chevanne, M., Collard, J., Seux, R., Involvement of Type I and Type II mechanism in Gram-positive and Gram-negative bacteria photosensitization by a meso-substituted cationic porphyrin. *Solar energy*, **82**, 1107-1117, 2008.
- [163] Gust, D., Moore, T. A., Moore, A. L., Jori, G., Reddi, E. The photochemistry of carotenoids, some photosynthetic and photomedical aspects. *Ann. New York Academy Sci.*, **691**, 32-47, 1993.
- [164] Baltschun, D., Beutner, S., Briviba, K., Martin, H-D., Paust, J., Peters, M., Röver, S., Stahl, H., Steigel A., Stenhorst, F. Singlet oxygen quenching abilities of carotenoid, *Liebigs Ann.*, 1887-1893, 1997.
- [165] Martin, H. D., Ruck, C., Schmidt, M., Sell, S., Beutner, S., Mayer, B., Walsh, R. Chemistry of carotenoid oxidation and free radical reactions. *Pure Appl. Chem.* **71**, 2253-2262, 1999.
- [166] Montenegro, M. A., Nazareno, M. A., Durantini, E. N., Borsarelli, C. D. Singlet molecular oxygen quenching ability of carotenoids in reverse-micelle membrane mimetic system. *Photochem. Photobiol.*, **75**, 353-361, 2002.
- [167] Silva, A.R., Ribeiro, J.N., Rettori, D., Jorge, R.A. Type II photooxidation mechanism of biomolecules using chloro (5,10,15,20-Tetraphenylporphyrinato) indium (III) as a photosensitizer. *J. Braz. Chem. Soc.*, **19**, 1311-1320, 2008.
- [168] Aveline, B. M., Sattler, R. M., Redmond, R. W., Environmental effects on cellular photosensitization: correlation of phototoxicity mechanism with transient absorption spectroscopy measurements. *Photochem. Photobiol.*, **68**, 51-62, 1998.
- [169] Mora, S. J., Milanesio, M. E., Durantini, E. N. Spectroscopic and photodynamic properties of 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-N,N-dimethylaminopropoxy)phenyl]porphyrin and its tetracationic derivative in different media. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **270**, 75-84, 2013.
- [170] Caminos, D. A., Spesia, M. B., Durantini, E. N. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by novel meso-substituted porphyrins by 4-(3-N,N,N-trimethylammoniumpropoxy)phenyl and 4-(trifluoromethyl)phenyl groups. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **5**, 56-65, 2006.
- [171] Mantareva, V., Kussovski, V., Angelov, I., Borisova, E., Avramov, L., Schnurpfeil, G., Wöhrle, D. Photodynamic activity of water-soluble phthalocyanine zinc(II) complexes against pathogenic microorganisms. *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 4829-4835. 2007.

- [172] 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. *Eur. J. Med. Chem.*, **47** (6), 2198-2205, 2010.
- [173] Kobayashi, N., Ishizaki, T., Ishii, K., Konami H. Synthesis, Spectroscopy, and Molecular Orbital Calculations of Subzaporphyrins, Subphthalocyanines, Subnaphthalocyanines, and Compounds Derived Therefrom by Ring Expansion I *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 9096-9110, 1999.
- [174] Berg, K., Bomme, J.C., Moan, J. Evaluation of sulfonated aluminium phthalocyanines for use in photochemotherapy. A study on the relative efficiencies of photoinactivation. *Photochem. Photobiol.*, **49**, 587-594, 1988.



196