

**EVALUACIÓN DEL EFECTO FOTOTÓXICO DE LA  
TETRASULFOFTALOCIANINA DE COBRE SOPORTADA EN  
DIÓXIDO DE TITANIO SOBRE EL CRECIMIENTO IN VITRO DE  
CÉLULAS HeLa**

**MARIO ALBERTO BARÓN RODRÍGUEZ**

**ROCÍO DEL PILAR NIÑO MOYANO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CATÁLISIS  
BUCARAMANGA  
2005**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO FOTOTÓXICO DE LA  
TETRASULFOFTALOCIANINA DE COBRE SOPORTADA EN  
DIÓXIDO DE TITANIO SOBRE EL CRECIMIENTO IN VITRO DE  
CÉLULAS HeLa**

**MARIO ALBERTO BARÓN RODRÍGUEZ**

**ROCÍO DEL PILAR NIÑO MOYANO**

**Trabajo de grado para optar el título de químico**

**Directores:**

**EDGAR PÁEZ MOZO, Químico Ph.D.  
RAQUEL OCAZIONES, Microbióloga Ph.D.  
FERNANDO MARTÍNEZ ORTEGA, Químico Ph.D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CATÁLISIS  
BUCARAMANGA  
2005**

Bucaramanga, agosto 2005

A Dios, por que cada vez que intenté desfallecer colocó en mi camino al ser indicado.

A Plaxidia y José Doenitz, mis padres, por que cada día de nuestras vidas me han sabido enseñar que el amor no tiene límites.

A Mario A., por que con su paciencia y amor me da la fuerza necesaria para culminar pequeños y grandes sueños.

A Mateo, mi hijo, porque es el sol de mi mañana, el soplo de mi vida, la vida de mi vida.

*Rocío.*

A ese Mateo, quien me alimenta el espíritu cada mañana al despertar.  
Motivo que me sostiene para seguir adelante, aun ante las  
adversidades.

A Roci, mi compañera de vida y amiga, quien me apoya y ama.

A Mario, Paz Eugenia, Maria Mercedes y Daniel Eduardo; mis padres y  
hermanos, quienes en el regazo de su hogar, me han enseñado el valor  
de una familia.

*Mario Alberto*

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseamos expresar nuestra gratitud a quienes colaboraron de alguna forma con la elaboración de este trabajo de grado, especialmente a:

La doctora Raquel Ocaziones; nuestra directora, por su valiosa motivación, orientación y coordinación durante el proceso de este trabajo y primordialmente por creer en nosotros.

Los doctores Edgar Páez Mozo y Fernando Martínez Ortega, nuestros directores, por su apoyo, y su invaluable contribución al desarrollo de este trabajo.

Los doctores Jesús Solier Insuasty y Nelson Gamboa Toloza, por que con agrado y motivación aceptaron valorar nuestro trabajo.

La doctora Maria Mercedes Bravo, del Instituto Nacional de Cancerología, quien generosamente nos obsequió las células HeLa.

La doctora Patricia Escobar y al doctor José Antonio Henao, por su colaboración oportuna y desinteresada.

Todos nuestros compañeros del Centro de Investigaciones en Catálisis (CICAT), que de alguna forma u otra cooperaron con la elaboración de este trabajo.

Los integrantes del Laboratorio de Virología (CINTROP-UIS) por su participación activa en el manejo y mantenimiento de los cultivos y especialmente a Fabián Cortés, por sus sugerencias y comentarios.

María Mercedes Barón Rodríguez, por su participación en la elaboración del análisis estadístico.

A nuestras familias y compañeros de carrera que de alguna forma nos ayudaron a construir este sueño.

## CONTENIDO

	Pág
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS</b>	5
<b>1.1. CÁNCER DE CÉRVIX</b>	5
1.1.1. <i>Características de las células cancerígenas</i>	5
1.1.2. <i>Epidemiología</i>	7
1.1.3. <i>Clasificación</i>	7
1.1.4. <i>Tratamientos convencionales</i>	8
<b>1.2. TERAPIA FOTODINÁMICA UN TRATAMIENTO ALTERNATIVO CONTRA EL CÁNCER</b>	12
1.2.1. <i>Historia de la TFD</i>	12
1.2.2. <i>Mecanismos de acción de la TFD</i>	16
1.2.3. <i>Excitación del fotosensibilizador</i>	18
1.2.4. <i>Fotosensibilizadores</i>	19
1.2.5. <i>Oxido de titanio</i>	40
1.2.6. <i>Luz</i>	45
<b>2. OBJETIVOS</b>	47
<b>2.1. OBJETIVO GENERAL</b>	47
<b>2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	47

<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b>	48
<b>3.1. SÍNTESIS DEL DIÓXIDO DE TITANIO</b>	48
<b>3.2. ANCLAJE DE LA TETRASULFOFTALOCIANINA DE COBRE AL DIÓXIDO DE TITANIO</b>	51
<b>3.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS</b>	51
3.3.1. <i>Difracción de rayos X</i>	52
3.3.2. <i>Espectroscopia de absorción molecular ultravioleta/visible (UV-VIS)</i>	52
3.3.2. <i>Espectroscopia de absorción en el infrarrojo (IR)</i>	53
<b>3.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOTÓXICA</b>	54
3.4.1. <i>Curva de crecimiento celular HeLa</i>	54
3.4.2. <i>Evaluación del efecto fototóxico de los compuestos</i>	55
3.4.3. <i>Evaluación del efecto tóxico de los compuestos</i>	57
3.4.4. <i>Análisis estadístico</i>	57
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	59
<b>4.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS</b>	59
4.1.1. <i>Síntesis y caracterización del TiO<sub>2</sub></i>	59
4.1.2. <i>Caracterización de la tetrasulfoftalocianina de cobre</i>	64
4.1.3. <i>Anclaje de la tetrasulfoftalocianina al dióxido de titanio y caracterización</i>	66

<b>4.2. EVALUACIÓN <i>IN-VITRO</i> DE LA ACTIVIDAD</b>	
<b>FOTOTÓXICA DE LOS COMPUESTOS</b>	70
<i>4.2.1. Curva de crecimiento celulas HeLa</i>	71
<i>4.2.2. Efecto de la distancia y tiempo de irradiación</i>	72
<i>4.2.3. Efecto toxico de los compuestos</i>	73
<i>4.2.4. Efecto fototóxico de los compuestos</i>	77
<b>5. CONCLUSIONES</b>	85
<b>6. RECOMENDACIONES</b>	86
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	88
<b>ANEXO A. ESPECTRO DE EMISIÓN DEL LÁSER</b>	115

## LISTA DE FIGURAS

	Pág
<b>Figura 1.</b> Localización de los tumores del aparato reproductor femenino	5
<b>Figura 2.</b> Estructura química de la hematoporfirina y su componente activo la porfirina	15
<b>Figura 3.</b> Esquema del proceso fotoquímico del mecanismo tipo I	17
<b>Figura 4.</b> Esquema del proceso fotoquímico del mecanismo tipo II	17
<b>Figura 5.</b> Diagrama modificado de <i>Jablonsky</i> para un fotosensibilizador	19
<b>Figura 6.</b> Estructura de la tetrasulfofenilporfirina	22
<b>Figura 7.</b> Estructura química de la 21-tio y 21-selenotetrafenilporfirinas	24
<b>Figura 8.</b> Estructuras químicas del ALA y la Protoporfirina IX	26
<b>Figura 9.</b> Esquema de la obtención de la clorina y bacterioclorina	28
<b>Figura 10.</b> Estructura química de la Clorina e <sub>6</sub> y análogos	29
<b>Figura 11.</b> Estructura química de la pentametil esterbenzobacterioclorina	30
<b>Figura 12.</b> Estructura química de la verteporfirina	30
<b>Figura 13.</b> Estructura de la etiopurina de estaño	31
<b>Figura 14.</b> Estructura de la 5,10,15,20-tetra(3-hidroxifenil)-2,3-dihidroporfirina	33

<b>Figura 15.</b>	Estructura química de la 2,3-dihidro-5,15-di(3,5-dihidroxifenil)porfirina	34
<b>Figura 16.</b>	Estructura química del Photochlor	35
<b>Figura 17.</b>	Estructura química del texafrin de Lutecio	36
<b>Figura 18.</b>	Estructuras químicas de la ftalocianina y ftalocianina metálica	38
<b>Figura 19.</b>	Estructura química de la tetrasulftalocianina metálica	38
<b>Figura 20.</b>	Principio de fotosensibilización del TiO <sub>2</sub>	44
<b>Figura 21.</b>	Fuente láser disponible en el laboratorio	46
<b>Figura 22.</b>	Procedimiento usado para de la síntesis del TiO <sub>2</sub>	50
<b>Figura 23.</b>	Distribución de fármacos en placas de 24 pozos	57
<b>Figura 24.</b>	Difractograma de rayos X del TiO <sub>2</sub> sintetizado	60
<b>Figura 25.</b>	Espectro de reflectancia difusa de absorción molecular ultravioleta visible del TiO <sub>2</sub> sintetizado por un método sol gel.	61
<b>Figura 26.</b>	Espectro de reflectancia difusa de absorción molecular ultravioleta visible del TiO <sub>2</sub> Degussa Hulls	61
<b>Figura 27.</b>	Espectro de absorción molecular en el infrarrojo del TiO <sub>2</sub> sintetizado	62
<b>Figura 28.</b>	Espectro de absorción molecular en el infrarrojo del TiO <sub>2</sub> P25 Degussa Hulls (comercial)	63
<b>Figura 29.</b>	Espectro de absorción molecular UV-VIS de la TsPcCu en PBS 1X	65

<b>Figura 30.</b>	Espectro de absorción molecular en el infrarrojo de la TsPcCu	66
<b>Figura 31.</b>	Difractograma de rayos X del TiO <sub>2</sub> sintetizado y sensibilizado con TsPcCu al 0,5% p/p	67
<b>Figura 32.</b>	Espectro de reflectancia difusa de absorción molecular ultravioleta visible del TiO <sub>2</sub> sintetizado y sensibilizado con TsPcCu al 0,5% p/p.	67
<b>Figura 33.</b>	Espectro de absorción molecular en el infrarrojo de TiO <sub>2</sub> sintetizado y sensibilizado con TsPcCu al 0,5% p/p.	68
<b>Figura 34.</b>	Curva de crecimiento células HeLa	72
<b>Figura 35.</b>	Efectos de la distancia, tiempo e intensidad de irradiación sobre el crecimiento y viabilidad de células HeLa	73
<b>Figura 36.</b>	Comparación del efecto tóxico de los compuestos sobre cultivos de células Hela.	76
<b>Figura 37.</b>	Comparación del efecto fototóxico de los compuestos sobre cultivos de células HeLa	81
<b>Figura 38.</b>	Efecto de la luz sobre la actividad de los compuestos	82
<b>Figura 39.</b>	Superposición del espectro de absorción UV/Vis de la TsPcCu, con el espectro de emisión del láser.	83

## LISTA DE TABLAS

		Pág
<b>Tabla</b>	Asignación de las principales bandas de absorción de	
<b>1.</b>	los espectros infrarrojos del TiO <sub>2</sub> sintetizado y comercial.	62
<b>Tabla</b>	Principales bandas de absorción en el infrarrojo de la	
<b>2.</b>	TsPcCu anclada al TiO <sub>2</sub> , comparándolas con las bandas de absorción de la TsPcCu.	70
<b>Tabla</b>	Efecto tóxico de los compuestos sobre el crecimiento	
<b>3.</b>	(No.) y la viabilidad (V) de células Hela.	75
<b>Tabla</b>	Efecto fototóxico de los compuestos sobre el	
<b>4.</b>	crecimiento (No.) y la viabilidad (V) de células Hela.	77

## ABREVIATURAS

<b><i>m</i>THPC</b>	5,10,15,20-tetra(3-hidroxifenil)-2,3-dihidroporfirina
<b>ALA</b>	Ácido 5-Aminolevulínico
<b><math>h^+</math><sub>VB</sub></b>	Agujeros positivos en la banda de valencia
<b><math>O_2^-</math></b>	Aniones superóxido
<b>cm</b>	Centímetros
<b>DRX</b>	Difracción de Rayos X
<b>TiO<sub>2</sub></b>	Dióxido de titanio
<b>Pc</b>	Electrones en la banda de conducción
<b>SnET2</b>	Etiopurina de estaño
<b><i>h</i><math>\nu</math></b>	foton
<b>Pc</b>	Ftalocianina
<b>PcM</b>	Ftalocianina metálica
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>g</b>	Gramos
<b>Hp</b>	Hematoporfirina
<b>HpD</b>	Hematoporfirina derivada
<b>h</b>	horas
<b>IR</b>	Infrarrojo
<b>J</b>	Julio

<b>HeLa</b>	Línea celular humana de cáncer de cérvix
<b>l</b>	Longitud de onda
<b>mg</b>	microgramo
<b>mL</b>	mililitro
<b>nm</b>	nanometro
<b><sup>3</sup>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno en estado basal
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno singulete
<b>PBS</b>	<i>Phosphatum buffer saline</i> (Bufer salino de fosfato)
<b>HPPH</b>	Photochlor
<b>PpIX</b>	Protoporfirina IX
<b>HO·</b>	Radicales hidroxilo
<b>O<sub>2</sub>·</b>	Radicales superóxido
<b>S</b>	Sensibilizador
<b>S<sup>0</sup></b>	Sensibilizador en estado basal
<b><sup>1</sup>S*</b>	Sensibilizador en estado excitado singulete
<b><sup>3</sup>S*</b>	Sensibilizador en estado excitado triplete
<b>S*</b>	Sensibilizador exitado
<b>Sub</b>	Substrato orgánico
<b>Sub oxi</b>	Substrato orgánico oxidado
<b>SBF</b>	Suero bovino fetal
<b>T</b>	Temperatura

<b>TFD</b>	Terapia fotodinámica
<b>TPP</b>	Tetrafenilporfirina
<b>TPPS<sub>4</sub></b>	Tetrasulfofenilporfirina
<b>TsPcCu</b>	Tetrasulfoftalocianina de cobre
<b>TsPcCu-</b>	Tetrasulfoftalocianina de cobre anclada en dióxido de
<b>TiO<sub>2</sub></b>	titanio
<b>PcM</b>	Tetrasulfoftalocianina metálica
<b>t</b>	tiempo
<b>UV</b>	Ultravioleta

**TITULO:** EVALUACIÓN DEL EFECTO FOTOTÓXICO DE LA TETRASULFOFTALOCIANINA DE COBRE SOPORTADA EN DIÓXIDO DE TITANIO SOBRE EL CRECIMIENTO *IN VITRO* DE CÉLULAS HeLa.\*

**AUTORES:** ROCÍO DEL PILAR NIÑO MOYANO  
MARIO ALBERTO BARÓN RODRÍGUEZ\*\*

**PALABRAS CLAVES:** tetrasulfoftalocianina de cobre, terapia fotodinámica, dióxido de titanio.

**RESUMEN:** La Terapia fotodinámica (TFD) es una nueva modalidad en el tratamiento contra el cáncer, basada en la coexistencia de tres componentes: un fotosensibilizador, oxígeno molecular y luz. En este trabajo se estudió el efecto fotodinámico *in vitro* de la TsPcCu libre y anclada sobre el TiO<sub>2</sub> nanoparticulado en células humanas de cáncer de cérvix (HeLa). El TiO<sub>2</sub> en tamaño nanométrico se obtuvo con un nuevo método, por hidrólisis de tetraisopropóxido de titanio con una mezcla agua 2-propanol. La tetrasulfoftalocianina de cobre (II), se ancló al TiO<sub>2</sub> sintetizado.

Los materiales preparados se caracterizaron por espectroscopia UV-Vis, IR y DRX. El espectro de absorción del TsPcCu - TiO<sub>2</sub> es típico del cromóforo ftalocianina. Cada fotosensibilizador se suspendió en una mezcla de RPMI-PBS. Las células se incubaron por 7 h con los sensibilizadores (10, 9.95 y 0.05 µg/mL de TsPcCu-TiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub> y TsPcCu respectivamente) y luego se irradiaron durante 1 h (~ 665 nm, 10 J/cm<sup>2</sup>).

Los compuestos mostraron ser no tóxicos en ausencia de luz. En general se observó que tanto la densidad como la viabilidad celular, muestran cierta tendencia a disminuir con respecto al control negativo, cuando los cultivos son tratados con los compuestos bajo irradiación, no se apreció un efecto potenciador del TiO<sub>2</sub> sobre la actividad fototóxica de la TsPcCu. Bajo las condiciones de tiempo e intensidad de irradiación empleados, el TiO<sub>2</sub> preparado mostró el mejor efecto fotooxidativo, aún cuando el uso del láser garantiza la exclusión de luz ultravioleta responsable de la activación del TiO<sub>2</sub>.

---

\* Trabajo de grado.

\*\* Facultad de Ciencias, Química. Dra. Raquel Ocazonez, Dr. Edgar Páez Mozo y Dr. Fernando Martínez Ortega.

**TITLE:** EVALUATION OF THE PHOTOTOXIC EFFECT OF COPPER (II) TETRASULFOPHTHALOCYANINE ANCHORED TO TITANIUM DIOXIDE IN GROWTH *IN VITRO* OF HeLa CELLS.\*

**AUTHORS:** ROCÍO DEL PILAR NIÑO MOYANO  
MARIO ALBERTO BARÓN RODRÍGUEZ\*\*

**KEYWORDS:** copper (II) tetrasulfophthalocyanine, photodynamic therapy, titanium dioxide.

**ABSTRACT:** The photodynamic therapy (PDT) is a new modality in the treatment against the cancer, based on the coexistence of three components: a fotosensibilizador, molecular oxygen and light. In this work was evaluated the photodynamic effect *in vitro* of free and anchored TsPcCu on nano-sized TiO<sub>2</sub> in human cervix cancer cells (HeLa). The nano-sized TiO<sub>2</sub> is obtained by hydrolysis of titanium tetraisopropoxide with a mixture water 2-propanol, and then, the copper (II) tetrasulfophthalocyanine was anchored to TiO<sub>2</sub>.

The prepared materials were characterized by DRX, UV-Vis and IR spectroscopy. The spectral patterns of the TsPcCu - TiO<sub>2</sub> are typical of phthalocyanine. Each photosensitizer was suspended in RPMI-PBS mixture. The cells are incubated for 7 h with the sensitizer (10, 9.95 and 0.05 µg/mL to TsPcCu-TiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub> and TsPcCu respectively) and then were irradiated for 1 h ( $\lambda \sim 665$  nm, 10 J/cm<sup>2</sup>).

The compounds showed to be nontoxic in the dark. In general the cell number and viability, shows certain tendency to diminish with respect to the negative control, when the cultures are dealt with compounds under irradiation was not appraised a synergy effect of the TiO<sub>2</sub>, on the phototoxic activity of the TsPcCu. TiO<sub>2</sub> showed the highest photoactivity, even though the use of the laser guarantees the exclusion of ultraviolet light, responsible for the activation of the TiO<sub>2</sub>.

---

\* Facultad de Ciencias.

\*\* Grade work. Chemistry. Dra. Raquel Ocazonez, Dr. Edgar Páez Mozo y Fernando Martínez Ortega.

## INTRODUCCIÓN

Después del cáncer de mama, el carcinoma de cérvix es el segundo caso más frecuente en el mundo entre las neoplasias femeninas (Yu et al, 2005; Cifuentes et al, 2004; Harima et al, 2000 y Connolly et al, 2000). El tratamiento más comúnmente usado es la radioterapia que puede causar irritaciones en otros tejidos circundantes. Cuando el cáncer se encuentra en un estado avanzado se recurre a la cirugía, dejando a cientos de mujeres potencialmente estériles (Carter et al, 2005). Sin embargo, la terapia fotodinámica (TFD) es una novedosa técnica altamente selectiva para el tratamiento de una gran variedad de tipos de tumores cancerígenos (Vogl et al, 2004).

La TFD usa la combinación de luz visible, o luz cercana al visible con un fármaco fotosensible de mínima toxicidad en la oscuridad. (Gorman et al, 2004). El fotosensibilizador es excitado a estado triplete y este interactúa con el oxígeno molecular del medio produciendo especies citotóxicas tales como oxígeno singulete, aniones superóxido y radicales hidroxilo (Cauchon et al, 2005).

Las ftalocianinas (Pc) son moléculas complejas, con propiedades colorantes, candidatos promisorios para varias aplicaciones prácticas,

además pueden ser usadas como eficientes fotosensibilizadores en TFD de cáncer (Frackowiak et al, 2002 y Koval et al, 2001). Los fotosensibilizadores se activan en presencia de luz visible (alrededor de 670 nm), la cual penetra más profundamente dentro de los tejidos a diferencia de otros fotosensibilizadores aprobados por el uso clínico; como el Photofrin®. Otra particularidad que se puede destacar de las ftalocianinas es el aumento de sus funciones fotocatalíticas al ser ancladas a soportes sólidos (Hone et al, 2002).

Las Pc presentan baja solubilidad tanto en el agua como en solventes orgánicos. Para lograr un aumento de su solubilidad en medio acuoso se prefirió el uso de una tetrasulfoftalocianina (TsPc), en la cual el macrociclo ftalocianínico está sustituido con grupos hidrofílicos tipo sulfato ( $\text{SO}_3^-$ ) (Uzdensky et al). Al mismo tiempo las TsPc debido a la presencia de grupos  $\text{SO}_3^-$  hacen viable la formación de enlaces con soportes sólidos tales como el dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ); un semiconductor fotocatalítico, no tóxico utilizado ampliamente en sistemas bioquímicos, y ensayado en la desinfección de bacterias, hongos, virus y en cultivos de células cancerígenas con resultados promisorios (Blake et al, 1999). Por otra parte, se ha mostrado que la tetrasulfoftalocianina de cobre (TsPcCu) anclada en  $\text{TiO}_2$  (TsPcCu-

TiO<sub>2</sub>) inhibe el crecimiento de *Escherichia coli* al ser irradiada con luz visible con una eficiencia relacionada con la cantidad de TiO<sub>2</sub> (Yu et al, 2003).

En trabajos realizados por el Centro de Investigación en Catálisis (CICAT) y el Centro de Investigación en enfermedades tropicales (CINTROP) de la Universidad Industrial de Santander, se estudió el efecto fototóxico de las tetrasulfoftalocianinas metálicas (TsPcM) de Zinc, Cobre y Cobalto ancladas en TiO<sub>2</sub> sobre cultivos de células cancerosas de riñón de mono africano (LLCMK<sub>2</sub>). Se encontró que la TsPcCu anclada al TiO<sub>2</sub> (TsPcCu -TiO<sub>2</sub>) no presentó signos de toxicidad en la oscuridad y mostró un mayor efecto fototóxico obteniendo así, resultados prometedores para la aplicación de este fotosensibilizador (Manrique et al, 2002).

Teniendo en cuenta las consecuencias que acarrear los actuales tratamientos contra el cáncer de cérvix a las pacientes que lo padecen, se quiso hacer un aporte en la búsqueda de nuevos medicamentos.

Con base en la efectividad de la TFD, en las propiedades de la TsPcCu y las características del TiO<sub>2</sub> anteriormente descritas, se resolvió hacer el presente trabajo; que pretendió estudiar la actividad fototóxica de la

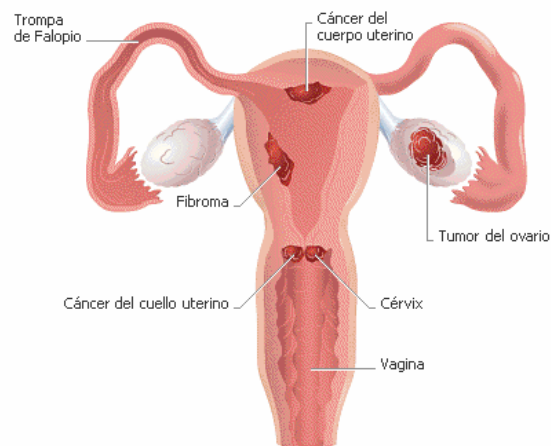
TsPcCu anclada en TiO<sub>2</sub>; sintetizado por el método de *sol-gel*, sobre el crecimiento *in vitro* de una línea celular humana derivada de cáncer de cérvix (HeLa). Los métodos de preparación *sol-gel* para el TiO<sub>2</sub> permiten la obtención de partículas con tamaños manométricos consiguiendo una mayor penetración del fármaco en los tejidos además de incrementar la fotoactividad de la TsPcCu.

El trabajo de investigación se desarrolló en dos etapas: Primera: síntesis y caracterización de los fotosensibilizadores con base en las espectroscopias de absorción molecular ultravioleta/visible, absorción en el infrarrojo y rayos X. Segunda: determinación *in vitro* de su efecto fototóxico sobre el crecimiento y viabilidad de células humanas de cáncer de cérvix (HeLa).

## 1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

### 1.1. CÁNCER DE CÉRVIX

El cáncer de cérvix es un tipo frecuente de cáncer en mujeres, y consiste en una enfermedad en la cual se encuentran células cancerosas (malignas) en los tejidos del cuello uterino (Figura 1) (Cifuentes et al, 2004).



**Figura 1.** Localización de los tumores del aparato reproductor femenino (Microsoft Corporation, 2004).

#### 1.1.1. *Características de las células cancerígenas*

En seres humanos y otros organismos multicelulares, el volumen de los tejidos individuales y los órganos es relativamente constante y acorde con el tamaño del cuerpo. Además, la organización de los tejidos entre los órganos y el carácter diferencial de las células individuales es

también estable. Esta estabilidad del volumen de los tejidos, diferenciación y organización es particularmente importante para el mantenimiento normal de las funciones. Sin embargo, en los organismos multicelulares los mecanismos de regulación controlados por la división celular algunas veces pueden descontrolarse. En esta situación la estabilidad de la organización de los tejidos y órganos es destruida, y en consecuencia surgen una variedad de enfermedades. Un ejemplo es la formación de tumores debido al crecimiento incontrolado. Los tumores pueden ser clasificados como benignos o malignos basados en su tendencia de dispersión. El término común para los tumores malignos es cáncer (Blake et al, 1999).

Frecuentemente las células de origen animal pueden ser cultivadas *in vitro*, independientemente de otras células. Estas imitan la tendencia de sus progenitoras formando monocapas, estas en contacto con un medio de cultivo se adhieren a la superficie lisa del vidrio o plástico. Por ejemplo, las primeras células cancerígenas que fueron satisfactoriamente aisladas y cultivadas fueron de carcinoma cervical en 1951. Estas células fueron nombradas células HeLa en honor a Henrietta Lacks, la mujer quien contrajo el carcinoma cervical y eventualmente murió por causa de esta enfermedad. Estas células han venido siendo cultivadas por más de cuarenta años. Las células HeLa

son usadas vigorosamente en todo el mundo como material de ensayo de la actividad biológica de diferentes fármacos (Blake et al, 1999).

### **1.1.2. Epidemiología**

Casi el 80% de los casos de cáncer de cuello uterino se presenta en los países en desarrollo. De estos, más de las 2/3 partes se diagnostican en estados avanzados. En los últimos 40 años, la tasa de incidencia y mortalidad han disminuido en casi todos los países desarrollados.

En Colombia, un informe del Instituto Nacional de Cancerología en 1998, lo sitúa en primer lugar de todos los carcinomas, representando el 26,8% de los cánceres en la mujer (Cifuentes et al, 2004)

### **1.1.3. Clasificación**

Las siguientes etapas se usan en la clasificación del cáncer cérvix:

*Estado 0:* Las células anormales se encuentran sólo en la primera capa de células que recubren el cuello uterino. *Estado I:* El cáncer afecta el cuello uterino, pero no se ha diseminado a los alrededores. *Estado II:* El cáncer se ha diseminado a áreas cercanas, pero aún se encuentra en el área pélvica. *Estado III:* El cáncer se ha diseminado a toda el área pélvica. Puede haberse diseminado a la parte inferior de la vagina, o

infiltrar los uréteres. *Estado IV:* El cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo (a la vejiga, al recto u órganos distantes como los pulmones (Cifuentes et al, 2004 y Novak et al, 1997).

#### **1.1.4. Tratamientos convencionales**

Los tratamientos para cáncer de cuello uterino dependen de la etapa en que se encuentra la enfermedad, el tamaño del tumor, la edad, estado de salud general y el deseo de tener hijos (Cifuentes et al, 2004).

##### *Estado 0*

1. Conización.
2. Cirugía con rayo láser.
3. Procedimiento de escisión electroquirúrgica (LEEP).
4. Criocirugía.
5. Cirugía para eliminar el área cancerosa, cuello uterino y útero (total abdominal o histerectomía vaginal) para aquellas mujeres que no pueden o no desean tener hijos.

##### *Estado I.*

- I-a: 1. Histerectomía abdominal total.
2. Conización (por deseo de embarazo).
  3. Histerectomía radical, (con o sin disección de ganglios linfáticos).
  4. Radioterapia.

I-b: 1. Radioterapia.

2. Histerectomía radical ampliada con o sin radioterapia.

*Estado II.*

II-a: 1. Radioterapia.

2. Histerectomía abdominal total.

II-b: 1. Radioterapia.

2. Ensayos clínicos de nuevas formas (radioterapia/quimioterapia).

*Estado III.* El tratamiento podría consistir en:

III-a: Radioterapia.

III-b: Ensayos clínicos de nuevas formas de radioterapia/quimioterapia.

*Estado IV.* El tratamiento podría consistir en:

IV-a: 1. Radioterapia.

2. Ensayos clínicos de nuevas formas (radioterapia/quimioterapia).

IV-b: 1. Radioterapia para aliviar los síntomas como el dolor.

2. Quimioterapia (Cifuentes et al, 2004).

### Quimioterapia

En sentido estricto, es el tratamiento de cualquier proceso mediante sustancias químicas: Sin embargo, se utiliza para referirse al tratamiento del cáncer mediante fármacos específicos que retrasan la tasa de crecimiento de las células tumorales (Díaz, 2000). Se espera que en el futuro la quimioterapia sea más específica hacia las células

tumorales malignas, explotando alguna característica propia de éstas que no compartan las células normales. Hasta la fecha, tal propiedad no ha sido descubierta, y los fármacos utilizados en quimioterapia son en general citotóxicos, para todas las células en división, tanto malignas como normales. Esta falta de especificidad es responsable de algunos de los efectos secundarios indeseables de la quimioterapia (Byrne, 1999).

Los efectos secundarios de la quimioterapia más comunes incluyen náuseas y vómitos, caída del cabello, cansancio y un aumento de probabilidades de moretones, sangrado y contraer una infección (Novak et al, 1997)

### Radioterapia

Se suele utilizar para el tratamiento del cáncer, la exposición de una zona determinada del organismo a una fuente de radiación ionizante. La radiación puede provenir de una fuente natural de isótopos radiactivos, ó de una fuente artificial de rayos X. El tratamiento incluye la localización precisa del tumor y la utilización de dosis fraccionadas múltiples, diarias o periódicas, de irradiación durante un periodo de tiempo determinado (©Microsoft Corporation, 2004).

La radiación ionizante lesiona las células mediante interacción con el ácido desoxirribonucleico (ADN) del núcleo, evitando la división celular normal. Al igual que los agentes citotóxicos utilizados en quimioterapia, la selectividad es limitada y se ocasionan lesiones a las células no cancerosas (Díaz, 2000)

Los posibles efectos secundarios de la radioterapia son: Fatiga y malestar, alteraciones en las células de la sangre, dificultad o dolor al deglutir, cambios en el sentido del gusto, sequedad de boca, anorexia, náuseas, vómitos, pérdida del cabello, aumento de infecciones, daño fetal en mujeres embarazadas, edema, caída o descamación, manchas, atrofia y dolor en la piel (Byrne, 1999).

### Recurrencia

En caso de presentarse después de un tratamiento con radioterapia, se pueden tratar con quimioterapia y ocasionalmente con cirugía. El 90% de las recurrencias se presentan dentro de los tres años del diagnóstico inicial, y menos del 5% de estas pacientes sobreviven los cinco años. En casos muy poco frecuentes se pueden dar posibilidades de curación (Ciefontes et al, 2004).

## **1.2. TERAPIA FOTODINÁMICA UN TRATAMIENTO ALTERNATIVO CONTRA EL CÁNCER**

La fotoquimioterapia frecuentemente llamada “terapia fotodinámica (TFD)”. Es una de las más prometedoras terapias anticáncer (Manyak et al, 1998). La TFD es basada en el concepto que ciertos fotosensibilizadores pueden ser localizados en tejidos neoplásicos, y subsecuentemente, estos pueden ser activados con luz de una apropiada longitud de onda (energía) para generar especies moleculares activas, tales como radicales libres y oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), especies tóxicas que por oxidación destruyen el tejido circundante (Chwilkowska et al, 2002 y Reddan et al, 1999). Es una terapia binaria y tiene una ventaja potencial ya que tiene una doble selectividad, la primera selectividad es desarrollada por el incremento de la concentración del fármaco en el tejido dañado, y la segunda, la irradiación puede ser limitada a un sitio específico. La selectividad puede ser aumentada cuando el fotosensibilizador se enlaza a moléculas del sistema que tengan alta afinidad por los tejidos afectados (Hasan et al, 2000).

### **1.2.1. Historia de la TFD**

La combinación de sustancias fotosensibilizantes y su exposición a la luz, constituye uno de los tratamientos más antiguos en Dermatología.

Ya en la India y en el antiguo Egipto, se ingería una planta rica en psoralenos, la *Ammi majus*, para el tratamiento del vitíligo, lepra y otras lesiones cutáneas. (Escudero et al, 2001).

El fenómeno de la TFD data desde 1900, cuando Oscar Raab un científico Alemán observó que los paramecios en una solución del colorante acridina bajo la exposición de luz se morían. Mientras que, en ausencia de luz con solución de acridina, ó con exposición de luz en ausencia de acridina los paramecios sobrevivían (Bruce, 2001).

Estas observaciones fueron seguidas por Von Tappeiner, quien usó colorantes tópicos para el tratamiento de lesiones cutáneas (Von Tappeiner, 1907 y 1903). Tappeiner introduce el término reacción fotodinámica como aquel procedimiento que necesita luz, una sustancia fotosensibilizante y oxígeno (Escudero et al, 2001).

Unos de los compuestos químicos más investigados hoy en TFD, son las porfirinas, Meyer-Betz en 1913, estudió la acumulación de la hemaroporfirina (Hp) y sus derivados en tumores de ratas y analizó los efectos posteriores de la TFD en su administración sistemática (Meyer-Betz, 1913).

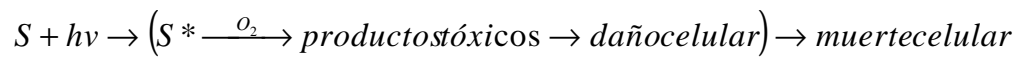
La fluorescencia de estos compuestos fue investigada para el diagnóstico y delineación de tumores malignos en la década de 1940 a 1950 por Figge y colaboradores (Figge et al, 1948). Lipson y Blades establecieron que el agente localizador del tumor era una impureza de la Hp y no el compuesto en sí (Lipson and Blades, 1960). Los investigadores empezaron entonces a buscar sustancias que marcaran mejor los tumores, y así fue como prepararon la hematoporfirina derivada (HpD, figura 2a), una mezcla de porfirinas producida por el tratamiento ácido de la Hp (Kessel and Chou, 1983).

Mas tarde Roswell Parl, un biólogo del Cancer Institute de Bufalo y varios cirujanos del Roswell Park consiguieron necrosificar tumores en pacientes con cáncer a los que se les había administrado la hematoporfirina derivada y habían sido expuestos a una dosis de energía lumínica. A partir de entonces comenzaron a multiplicarse los estudios de TFD en Europa, Japón y EEUU. Es así como el fotosensibilizador más empleado en terapia fotodinámica fue la hematoporfirina derivada y su componente activo la porfirina (figura 2b) que es conocido desde 1960 (Miller, 1999).



### **1.2.2. Mecanismos de acción de la TFD**

A nivel celular el mecanismo de acción fotodinámica puede describirse esquemáticamente como:

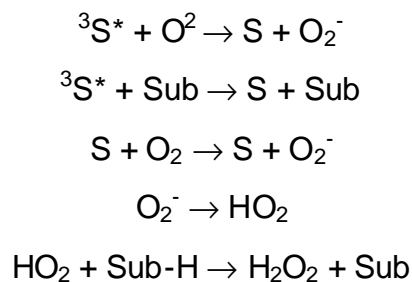


Donde S y S\* representan el estado basal y excitado, producto de la absorción del fotón  $hv$  por el sensibilizador (S) respectivamente. El mecanismo se divide en dos componentes, una parte regida por la fotofísica y fotoquímica del fotosensibilizador, y la segunda gobernada por la respuesta biológica de las células en presencia de las especies oxidantes generadas (Phillips, 1997).

En estos casos el fotosensibilizador actúa como un catalizador, ya que no es consumido en la reacción (Keizer et al, 2002). El modo de operación de la TFD esta basado en la excitación del fotosensibilizador por la luz visible. Después de la excitación existen dos mecanismos para la producción de especies muy reactivas (aniones superóxidos y/o oxígeno singlete  $^1O_2$ ) que conllevan a la posterior oxidación del substrato (Phillips, 1997).

#### Mecanismo tipo I

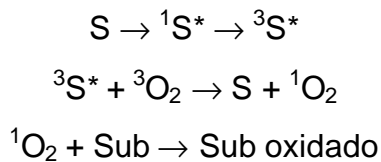
Como se observa en la figura 3, involucra la transferencia de un electrón o un ión de hidrógeno (H<sup>+</sup>) entre el sensibilizador excitado y el sustrato para obtener iones radicales y radicales libres. Estos últimos son muy reactivos, al interactuar con el oxígeno molecular generando especies como O<sup>-</sup>, O<sup>2-</sup> y OH<sup>-</sup>.



**Figura 3.** Esquema del proceso fotoquímico del mecanismo tipo I (Phillips, 1997).

#### Mecanismo tipo II

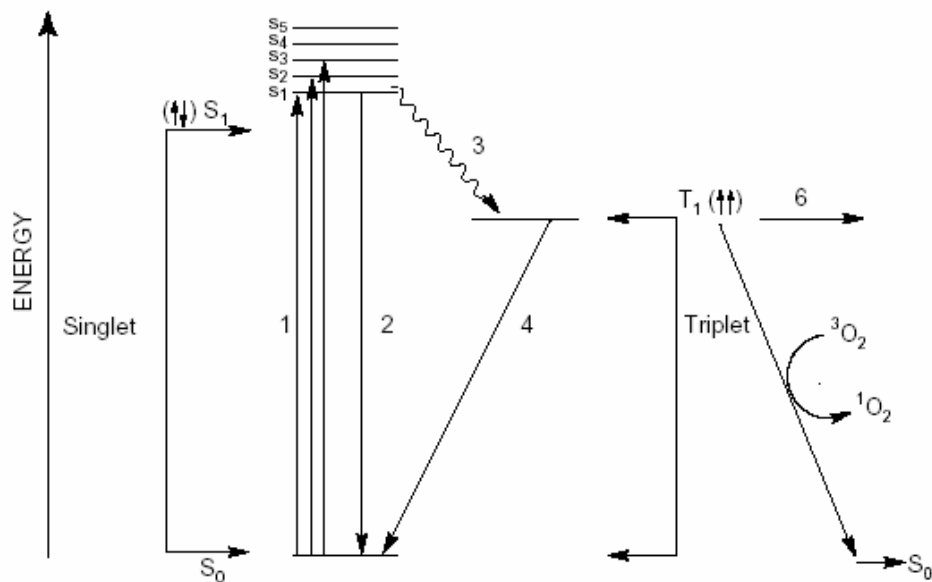
En este caso como se muestra en la figura 4, se presenta una transferencia de energía del fotosensibilizador excitado (estado triplete) al estado basal del oxígeno (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>) formando el oxígeno singulete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (Miller, 1999 y Phillips, 1997).



**Figura 4.** Esquema del proceso fotoquímico del mecanismo tipo II (Phillips, 1997).

### **1.2.3. Excitación del fotosensibilizador**

En la figura 5, se muestra un diagrama simplificado de *Jablonsky*, indicando que el fotosensibilizador posee una longitud de onda de máxima absorción. La luz incidente sobre el sensibilizador ( $^0S$ ) causa la excitación al estado excitado singulete ( $^1S^*$ ), el singulete excitado del colorante puede decaer al estado basal por la liberación de energía en forma de fluorescencia. Si el tiempo de vida del estado excitado del singulete es suficientemente largo ( $^1S^*$ ), es posible que el singulete sea convertido a un estado excitado triplete ( $^3S^*$ ) el cual es capaz de transferir su energía a otro triplete. Una de las pocas moléculas con estado basal triplete es el oxígeno diatómico, el cual se encuentra en la mayoría de las células y el aire. La transferencia de energía tiene lugar para formar el oxígeno singulete,  $^1O_2$ , considerado un agente altamente citotóxico, a partir del estado basal del oxígeno diatómico  $^3O_2$ . La energía provista por la molécula del sensibilizador excitado ( $^3S^*$ ), es mucho mas alta que la del producto oxígeno singulete (Phillips, 1997) y (Miller, 1999).



**Figura 5.** Diagrama modificado de *Jablonsky* para un fotosensibilizador donde: 1 Absorción de luz; 2 fluorescencia; 3 sistema de inter cruzamiento; 4 Fosforescencia; 5 producción de oxígeno singlete (mecanismo de tipo II); 6 transferencia de electrón (Mecanismo tipo I); El diagrama de *Jablonsky* es una representación de los niveles de energía electrónica y transición radioactiva de moléculas (Miller, 1999).

#### 1.2.4. Fotosensibilizadores

Los fotosensibilizadores son compuestos capaces de absorber luz de una determinada longitud de onda y transferirla al oxígeno molecular para la producción de agentes citotóxicos que causan la muerte celular (Brown, 1999).

En general un fotosensibilizador ideal debe tener las siguientes propiedades:

- ✓ Absorber luz en el infrarrojo cercano.
- ✓ No tóxico, con baja fotosensibilidad cutánea posterior.
- ✓ Retención relativamente selectiva hacia tumores en comparación con tejidos normales adyacentes.
- ✓ Generación eficiente de especies citotóxicas.
- ✓ Genere fluorescencia para visualización.
- ✓ De composición química definida, y preferiblemente soluble en agua (Phillips, 1997).

Los tipos más comunes de fotosensibilizadores se mencionan a continuación:

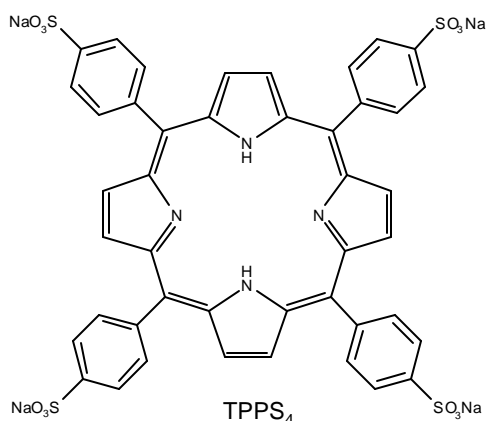
#### Hematoporfirinas derivadas y otros fotosensibilizadores porfirínicos

Las porfirinas son sustancias químicas de vital importancia, sintetizadas por casi todos los organismos vivos y necesarias para la respiración celular. La estructura molecular fundamental de las porfirinas consiste en un esqueleto cíclico de cuatro anillos unidos entre sí, o compuesto tetrapirrólico. Cada anillo tipo pirrol está formado por cuatro átomos de carbono y uno de nitrógeno. Los diferentes tipos de porfirinas se distinguen por los átomos que se unen al esqueleto cíclico y por los metales que ocupan la posición central. El componente mayoritario de la hemoglobina es el grupo hemo, que es una ferroporfirina. La

clorofila, que es la sustancia responsable del color verde de las plantas, es un derivado de una porfirina con magnesio (Detty et al, 2004).

La Hematoporfirina derivada, figura 2a, fue el primer fotosensibilizador que recibió aprobación clínica en Canadá en 1993 y subsecuentemente en U.S., Europa y Japón para el tratamiento del cáncer de cérvix, esófago, hígado, gástrico y endobronquial (Dennis et al, 2003). Mostró buenos resultados hasta que se conocieron ciertas desventajas. La HpD es una mezcla de componentes que incluyen el monómero, como el dímero y oligómeros de la hematoporfirina (Iinuma et al, 1999 y Dougherty, 1983). En la purificación parcial de esta mezcla resulta un producto comercial (Photofrin<sup>®</sup>) (Dougherty, 1984). Este producto purificado consiste en muchos componentes porfirínicos, alrededor de 60, los cuales son difíciles de reproducir en su manufactura (Reddan et al, 1999). El Photofrin<sup>®</sup> y otros sensibilizadores relacionados a las porfirinas tienen una banda de máxima absorción en la región roja del espectro ( $\approx 600$  nm donde la penetración de la luz en los tejidos es óptima) e induce una fotosensibilidad cutánea prolongada, de cuatro a seis semanas posterior a su administración (You et al, 2003 y Anderson et al, 1998).

Las Tetraaril porfirinas fueron las primeras porfirinas fácilmente preparadas y purificadas para ser evaluadas como fotosensibilizadores. La Tetrafenilporfirina (TPP) tiene una banda de máxima absorción de 630 nm y es un eficiente generador de especies citotóxicas pero tiene limitada solubilidad. La sulfonación de la TPP produce una tetrasulfonación y el producto es la tetrasulfofenilporfirina (TPPS<sub>4</sub>) (Figura 6). Los grupos de ácido sulfónico tienen valores muy bajos de pK<sub>a</sub> y permanecen en forma aniónica a lo largo de rangos de pH fisiológico, esta retiene los beneficios de la TPP y tiene una excelente solubilidad en agua (Berg et al, 1993). La TPPS<sub>4</sub> es permeable a las membranas y se acumula en los lisosomas celulares de los tejidos tumorales y es eficiente tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, la TPPS<sub>4</sub> presentó reportarse la neurotoxicidad en ratones cuando son expuestos a altas dosis (Winkelman and Collins, 1987).

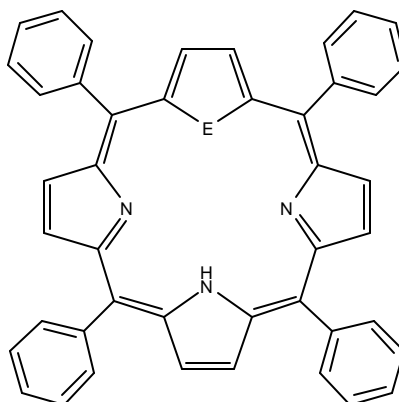


Trabajos con otras porfirinas derivadas sugieren novedosos aprovechamientos de las porfirinas con modificaciones en la periferia las cuales proveen superficies catiónicas y aniónicas demostrado alta solubilidad (Detty et al, 2004).

#### Porfirinas con el centro modificado

El intercambio de sustituyentes en la posición meso de las porfirinas aunque permite mejores propiedades biológicas no origina cambios apreciables en la longitud de onda de máxima absorción. Mientras que la sustitución de un NH en la posición 21 del anillo porfirínico con S o Se alcanza longitudes de onda de absorción alrededor de 665 nm en las porfirinas (Latos-Grazynski et al, 1996). Tales moléculas son denominadas porfirinas con centro modificado, como se muestra en la figura 7, el 21-tio- y 21-selenoporfirina (Hilmey et al, 2002). De igual manera, análogos sulfonados han venido siendo evaluados como fotosensibilizadores en TFD (Marcinkowska et al, 1997). La sustitución del nitrógeno por Se o S produce poco o ningún impacto en la generación de oxígeno singulete, estos compuestos son comparables a las clorinas por su eficiencia *in vivo* en ratones y la 21-selenoporfirina no muestra fotosensibilidad cutánea en animales irradiados 24 horas después de la inyección (You et al, 2003). La 21-tio porfirina tiene una

banda de máxima absorción cerca de 730 nm, pero su uso como fotosensibilizador aún no se ha reportado (Detty et al, 2004).



E= S 21-tiotetrafenilporfirina

E= Se 21-selenotetrafenilporfirina

**Figura 7.** Estructura química de la 21-tio y 21-selenotetrafenilporfirinas (Pushpan et al, 2001).

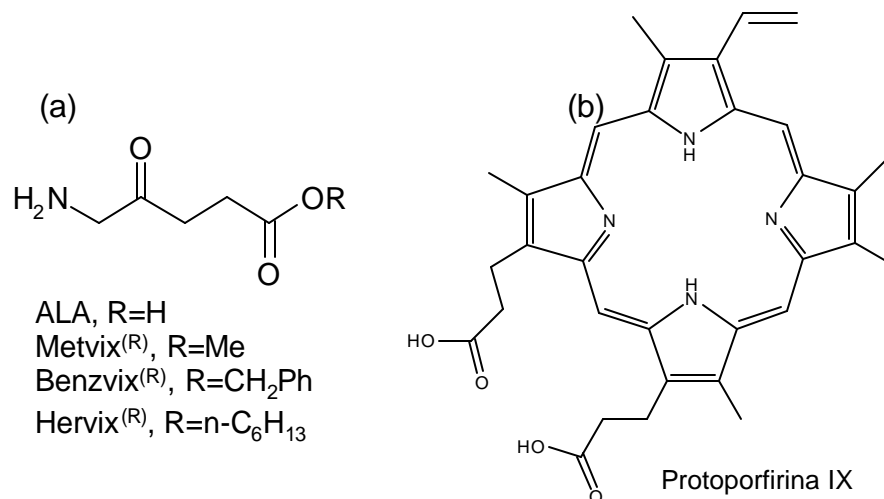
Remplazado el segundo heteroátomo con azufre o selenio se obtienen porfirinas modificadas con longitudes de onda de máxima absorción de ~695 – 700 nm (Ulman et al, 1978).

En la serie de porfirinas análogas a la tetrasulfofenil porfirinas (TPPS<sub>4</sub>) se ha realizado la sustitución con sulfonato arilo en la posición 5 y 10 del anillo porfirínico y con otros sustituyentes en la posición 15 y 20, mostrando óptimas propiedades tanto en la captación como en distribución celular y alcanzando hasta un 50% de muerte celular, también muestran reducción de la fotosensibilidad cutánea al ser

relacionadas con el Photofrin® (Hilmey et al, 2002; Stilts et al, 2000; Meng et al, 1994 y Kessel et al, 1987).

#### Ácido 5-aminolevulinico y protoporfirin IX

El ácido 5- aminolevulínico, ALA, figura 8 (a) es un aminoácido natural precursor de la protoporfirina IX (PpIX). La protoporfirina IX se encuentra actualmente bajo investigación como fotosensibilizador en TFD (Linuma et al, 1999). PpIX es convertida en el grupo hemo a través de la acción de la enzima ferroquelatasa. La administración exógena del ALA puede colmar de cierta manera la capacidad de la ferrocatalasa. Además la actividad de la ferrocatalasa es baja en ciertos tumores relacionados con el tejido normal (El-Sharabasy et al, 1992), factores que permiten una selectiva construcción de PpIX, figura 8 (b), en el tumor y la concentración de PpIX se encuentra en un máximo de una a seis horas después de la administración del ALA (Escudero et al, 2001).



**Figura 8.** (a) Estructura química del ALA y compuestos derivados. (b) Estructura química de la Protoporfirina IX (Peng et al, 1997)

El uso de PpIX como fotosensibilizador ha recibido aceptación europea en el tratamiento de queratosis actínica, de células cancerosas basales (Foley, 2003; Freeman et al, 2003 y Morton, 2003) y acción efectiva en la enfermedad de Darier (Exadaktylou et al, 2003). La fotosensibilización de la piel con PpIX es limitada de uno a dos días lo cual ofrece una ventaja con relación a la TFD con Photofrin<sup>®</sup>. Como Fotosensibilizador el PpIX tiene una banda de máxima absorción en 635 nm lo cual ofrece un pequeño mejoramiento con respecto al Photofrin<sup>®</sup> y otros fotosensibilizadores porfirínicos (Detty et al, 2004).

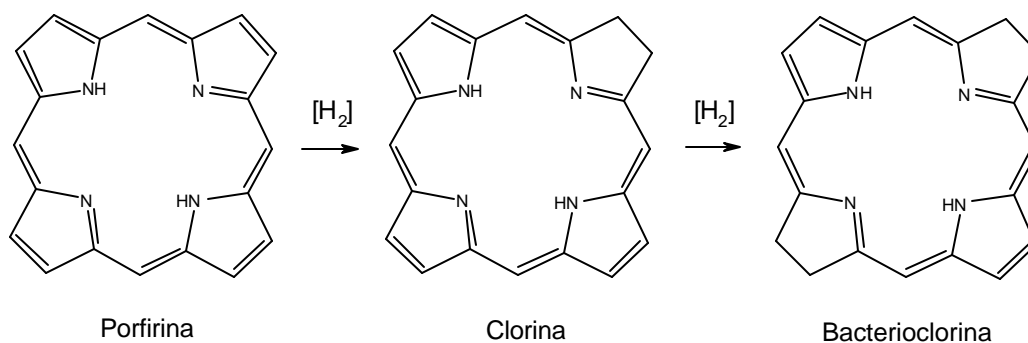
El desarrollo de PpIX como fármaco ha sido atribuido a los precursores del ALA. Mientras el ALA por si misma es hidrofílica, una variedad de

ésteres alquílicos del ALA penetran la célula mucho más rápido que esta (Gaulhier et al, 1997). Los ésteres bencílico y hexílico tienen indicaciones registradas para el tratamiento de cánceres intestinales y el diagnóstico de tumores de hígado, respectivamente (Dennis et al, 2003). La administración tópica del ALA y sus derivados han sido encontrados efectivos en la producción de PpIX en varias lesiones superficiales (Kennedy et al, 1996 y Kennedy et al, 1990). El PpIX se enlaza firmemente a una variedad de proteínas incluyendo el receptor benzodiazepínico de la periferia mitocondrial, proteínas hemo y mioglobina, las cuales sugieren sitios de acción en TFD (Chakraborti, 2003).

#### Clorinas y bacterioclorinas derivadas de fuentes naturales

Aunque el centro porfírinico es estable a la oxidación, lo cual permite la obtención de numerosos derivados y su ensayo (Sternberg et al, 1998); la longitud de onda de máxima absorción es demasiado corta para optimizar la penetración de luz en los tejidos. La reducción de uno de los dobles enlaces en la periferia del núcleo porfirina genera el centro clorina, y la posterior reducción de un segundo doble enlace pirrólico en la periferia de la clorina genera el centro bacterioclorina (figura 9). Ambas clases de moléculas poseen una banda de máxima absorción

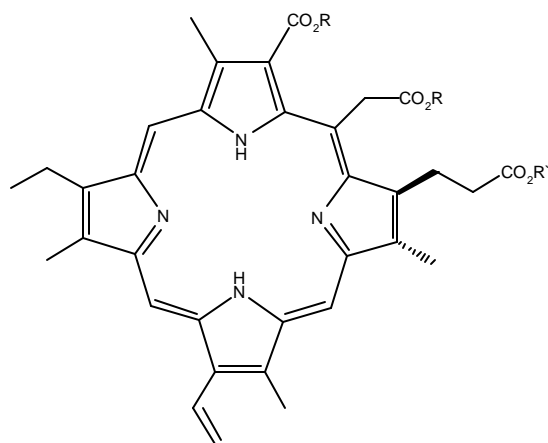
con longitud de onda más larga ( $\lambda_{\max} = 650 - 670$  nm para las clorinas y  $\lambda_{\max} = 730- 800$  nm para las bacterioclorinas) que las porfirinas y retienen la eficiencia de la generación de  $^1\text{O}_2$  (Kostenich et al, 1994). Diversas clorinas y bacterioclorinas están en varios estados de evaluación para su aplicación en TFD.



**Figura 9.** Esquema de la obtención de la clorina y bacterioclorina (Kostenich et al, 1994).

Una de las primeras clorinas evaluadas fue la clorina  $e_6$ . La clorina  $e_6$  es derivada de la oxidación de la clorofila  $a$  y tiene una banda de máxima absorción de 654 nm. Desafortunadamente, esta indica larga fotosensibilidad cutánea y requiere de altas dosis para ser efectiva (Sharman et al, 1999). El éster alquílico de la clorina  $e_6$  y el derivado mono-L-aspartilclorina  $e_6$  (figura 10) han sido encontradas más disponibles biológicamente a dosis mas bajas, por lo cual han

comenzado a ser evaluadas en TFD por no retenerse tópicamente (Wong et al, 2003).



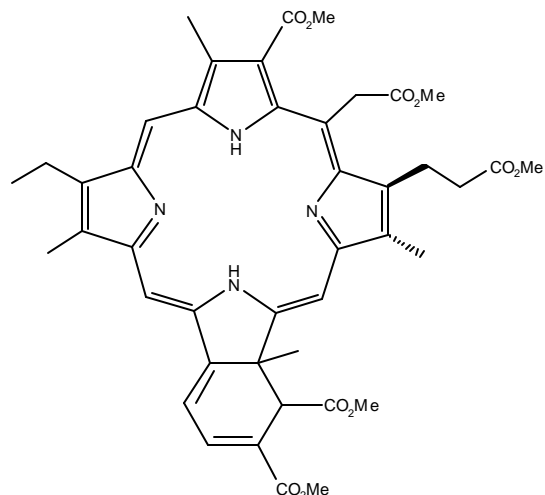
Clorina  $e_6$ ,  $R=R'=H$

mono-*L*-aspartilclorina  $e_6$ ,  $R=H$ ,  $R'=(L)\text{-NHCH}(\text{CO}_2\text{H})\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$

Trimetil esterclorina  $e_6$ ,  $R=R'=Me$

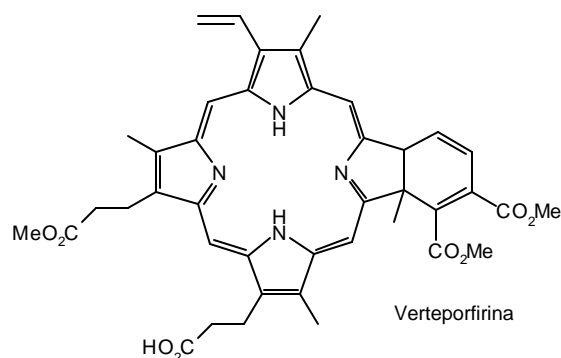
**Figura 10.** Estructura química de la Clorina  $e_6$  y análogos (Sharman et al, 1999).

Otro derivado se obtiene de la reacción Diels-Alder, de un grupo vinílico con el C-8 de la trimetil esterclorina  $e_6$ , generando una benzobacterioclorina (figura 11) con una banda de máxima absorción entre 737 y 805 nm. Muchos de estos compuestos relacionados muestran una limitada fotosensibilidad cutánea y son efectivos en dosis de  $5 \mu\text{mol kg}^{-1}$  con una intensidad de radiación de  $135 \text{ J cm}^{-2}$  en ratones con tumores (Li et al, 2003).



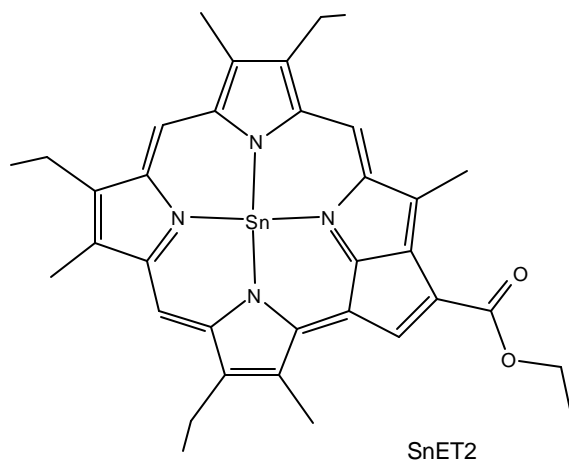
**Figura 11.** Estructura química de la pentametil esterbenzobacterioclorina (Li et al, 2003).

La ciclo adición de dimetil acetilenedicarboxilato a la PpIX proporciona un derivado benzoporfirinico (figura 12); la Verteporfirina, la cual tiene una banda de máxima absorción en 690 nm (Sharman et al, 1999). Esta muestra una limitada fotosensibilidad cutánea (3 a 5 días) y una rápida limpieza de los tejidos. La Verteporfirina se encuentra en ensayo clínico para el tratamiento de células cancerosas (Dennis et al, 2003)



**Figura 12.** Estructura química de la verteporfirina (Sharman et al, 1999).

Las clorinas y bacterioclorinas con metales centrales generan fotosensibilizadores muy útiles. La etiopurina de estaño (SnET2, figura 13) una clorina metalada, está siendo actualmente evaluada para el tratamiento del cáncer cutáneo de seno y células cancerosas (Dennis et al, 2003). Tiene una banda de máxima absorción a una longitud de onda de 660 nm. Sin embargo el tratamiento con la SnET2 imparte una larga fotosensibilidad cutánea, lo que limita su utilidad (Sharman et al, 1999).



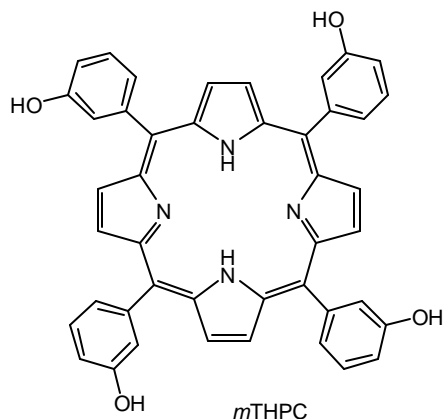
**Figura 13.** Estructura de la etiopurina de estaño (Detty et al, 2003).

Una de las complicaciones en las bacterioclorinas es la reacción de reoxidación a la correspondiente clorina o incluso a la correspondiente porfirina. La introducción de paladio a la bacterioclorina genera el Tookad; un derivado de bacterioclorina estable a la oxidación, evitando la regresión a la clorina. El Tookad tiene un máximo de absorción de

762 nm y muestra ser promisorio contra enfermedades que envuelven proliferación de vasos y cáncer de próstata (Huang et al, 2003).

### Clorinas sintéticas

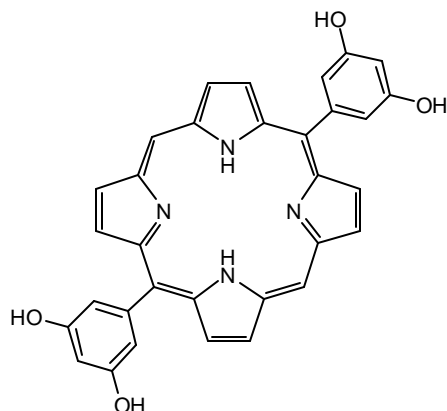
La clorina sintética 5,10,15,20-tetra(3-hidroxifenil)-2,3-dihidroporfirina (*m*THPC, figura 14) es quizás el fotosensibilizador más usado de las clorinas sintéticas. La *m*THPC ha sido aprobada en Europa para el uso contra el cáncer de cuello y cabeza, adicionalmente se han archivado las indicaciones para los tumores de próstata y páncreas (Dennis et al, 2003). También se ha usado eficazmente en el cáncer del seno recurrente para las lesiones de las paredes del tórax usando dosis de 0,10 mg Kg<sup>-1</sup>, con dosis de luz de 5 J cm<sup>-2</sup> a una longitud de onda de 652 nm (Wyss et al, 2001). Sin embargo, la *m*THPC presenta más de 6 semanas de fotosensibilidad cutánea; siendo una desventaja para su uso. Al contrario de muchos fotosensibilizadores, la mitocondria no aparece como el primer organelo dañado por la *m*THPC, sin embargo el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático son inactivados por esta mediante el tratamiento con TFD (Cramers et al, 2003).



**Figura 14.** Estructura de la 5,10,15,20-tetra(3-hidroxifenil)-2,3-dihidroporfirina (Detty et al, 2004).

Otras estructuras relacionadas con la *mTHPC* y que muestra actividad como fotosensibilizadores son:

La 2,3-dihidro-5,15-di(3,5-dihidroxifenil)porfirina (figura 15), posee una banda de máxima de absorción de 650 nm, es comparable con la *mTHPC*; respecto a la eficiente producción de  $^1\text{O}_2$ , y eficacia *in vitro* como *in vivo* en TFD (Bourre et al, 2003). Pero además esta se localiza velozmente en el tumor y su eliminación también es rápida; no produciendo fotosensibilidad cutánea (Ferrand et al, 2003).



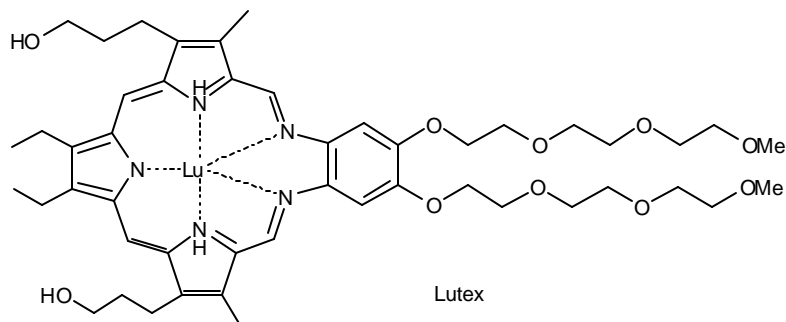
**Figura 15.** Estructura química de la 2,3-dihidro-5,15-di(3,5-dihidroxifenil)porfirina (Bourre et al, 2003).

El glucoconjugado tri(3-hidroxifenil)clorina, es un fotosensibilizador que ha venido mostrando mayor fototoxicidad que la *m*THPC y una superior afinidad por la mitocondria (Laville et al, 2003). Se requiere que la *m*THPC posea cuatro veces la concentración del Fs para adquirir el mismo nivel de fototoxicidad (Detty et al, 2004).

Otro potente fotosensibilizador *in vivo* emerge de la adición Markovnikoff del *n*-hexanol al grupo vinílico del pirofeoforbide-*a* metil ester, Esta clorina sintética llamada Photochlor (HPPH; figura 16) posee una banda de máxima absorción en 665 nm y actualmente está siendo ensayada clínicamente en células de cáncer (Dennis et al, 2003).



elevada longitud de onda de máxima absorción (732 nm) y es un eficiente generador de  $^1\text{O}_2$ . El texafirin de lutecio se carga y se elimina rápidamente de las células, lo que genera una mínima fotosensibilidad cutánea pero; también produce una ventana del tratamiento estrecha de 4 a 6 horas después de la inyección (Sharman et al, 1999).



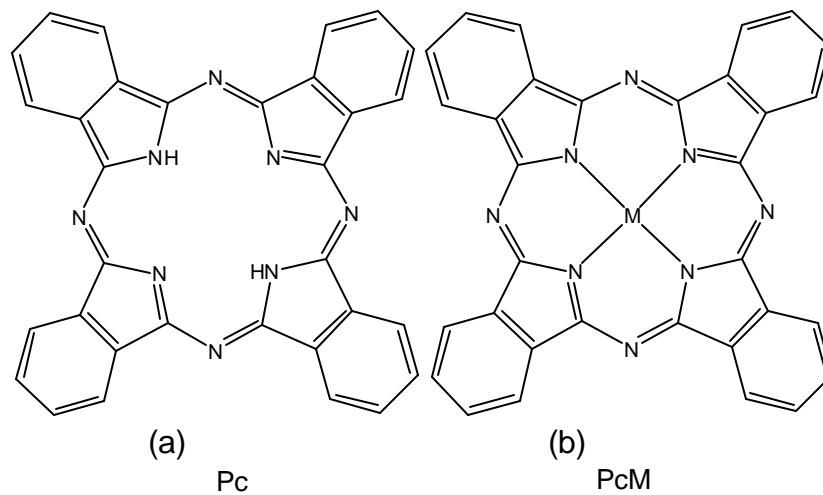
**Figura 17.** Estructura química del texafirin de Lutecio (Detty et al, 2004).

### **Ftalocianinas y compuestos relacionados**

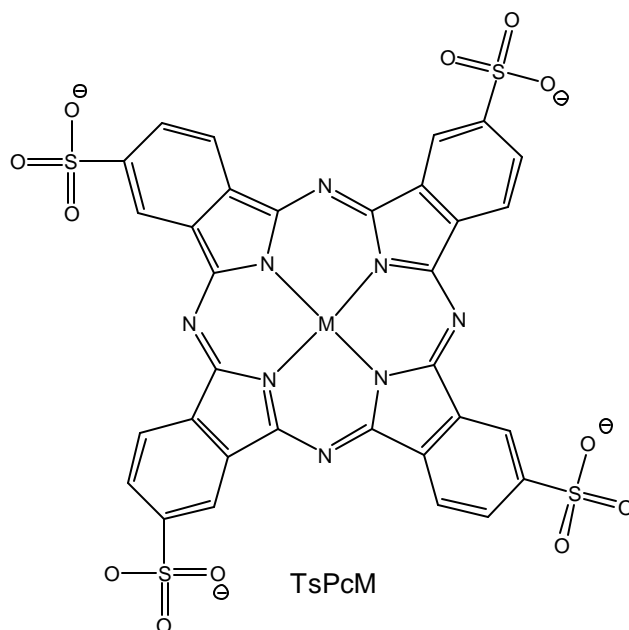
Las ftalocianinas como se observa en la figura 18 (a), son macrociclos tetrapirrólicos que al igual que las porfirinas tienen átomos de nitrógeno en vez de grupos metilénicos enlazando las unidades pirrólicas. La periferia del macrociclo se extiende por la representación de cuatro anillos bencénicos que fortalecen la absorción de radiación a mayores longitudes de onda comparadas con la porfirina (Escudero et al, 2001; Ferraudi, 1997; Phillips, 1997).

Las ftalocianinas metálicas (PcM), figura 18 (b), presentan gran estabilidad lumínica, química y térmica, y se activan en presencia de luz visible, de baja energía (600-750 nm) (Oekermann et al, 2001), que penetra más profundamente los tejidos. Estas han sido usadas extensamente como pigmentos o colorantes económicos y no tóxicos. Igualmente se han reportado como fotosensibilizadores potenciales en TFD del cáncer y elementos activos en sensores químicos como celdas solares y dispositivos optoelectrónicos (Miao, 1998).

En las ftalocianinas metálicas, la generación de las especies citotóxicas (Koval et al, 2001), está normalmente determinada por el tiempo de vida del sensibilizador en su estado triplete excitado, el cual a su vez está influenciado por la naturaleza del ión metálico (Phillips, 1997).



**Figura 18.** Estructura química de la (a) ftalocianina y (b) ftalocianina metálica (Gorman et al, 2004).



**Figura 19.** Estructura química de la tetrasulfoftalocianina metálica (TsPcM) (Abramczyk et al, 2004 y Liu et al, 2004).

Otra particularidad que se puede destacar de las ftalocianinas es el aumento de sus funciones fotocatalíticas al ser ancladas a soportes

sólidos, debido a la reducción del fenómeno de dimerización (Niño et al, 2000 y Jaramillo, 1990). No obstante una desventajas de las PcM es su baja solubilidad tanto en agua como en solventes orgánicos. Por lo cual para lograr un aumento de su solubilidad en medio acuoso muchas veces se prefiere el uso de una tetrasulfoftalocianina metálica, figura 19, en la cual el macrociclo está sustituido con grupos hidrofílicos (Abramczyk et al, 2004 y LaMuraglia et al, 1995). Al mismo tiempo las TsPcM debido a sus grupos  $\text{SO}_3^-$  hacen viable la formación de enlaces con soportes sólidos tales como el  $\text{TiO}_2$  (Zhao et al, 2004 y Zhan et al, 2002), un semiconductor fotocatalítico no tóxico utilizado ampliamente en sistemas bioquímicos (Blake et al, 1999). Consiguiendo una cooperación del semiconductor hacia el aumento del transporte de la energía capturada por el sensibilizador a especies presentes en el sistema, tales como el oxígeno molecular; para una subsiguiente formación de especies reactivas (Yu et al, 2003 y Ranjit et al, 1998).

Las ftalocianinas reciben un considerable interés para su uso en TFD, principalmente porque tienen un largo coeficiente de absorción en la región del espectro; donde la luz posee mayor penetración en los tejidos. Las ftalocianinas sulfonadas con centros metálicos son interesantes agentes en TFD; sin toxicidad local y sistémica (Ogunsipe et al, 2004 y RA et al, 1995). Sus propiedades fotosensibilizadoras

están siendo evaluadas extensamente en cultivos celulares y sobre condiciones *in vivo*. El grado de sulfonación, la composición isomérica y la naturaleza del ión metálico central afecta la solubilidad y la magnitud de agregación (Allen et al, 2002). La captación del fotosensibilizador en ensayos *in vitro* decrece con el grado de sulfonación. Sin embargo, la fototoxicidad no siempre es paralela a la captación y extraordinariamente en contraste, en ensayos *in vivo* aparece un incremento de la retención en el tumor con el incremento de la sulfonación (Abramczyk et al, 2004).

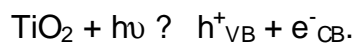
Estas moléculas son fácilmente preparadas y los derivados solubles en agua son preparados por sulfonación del anillo ftalocianínico (Detty et al, 2004).

#### **1.2.5. Oxido de titanio**

La fotocatalisis del  $TiO_2$  se ha venido estudiando extensamente los últimos 25 años, debido a su amplia utilidad para la oxidación de compuestos contaminantes orgánicos e inorgánicos en agua y aire, incluyendo hidrocarburos, alcoholes, cloruros de alquilo (Einaga et al, 2002 y Zavoianu et al, 2001), aromáticos (Shimizu et al, 2002) y grupos cianuro en forma libres y complejos disueltos en agua (Augugliaro et al,

1999), pesticidas (Tanaka and Reddy, 2002), desechos industriales y caseros (Rachel et al, 2002).

La fotocatalisis heterogénea esta basada en la absorción de luz por partículas semiconductoras de  $\text{TiO}_2$ . Solo los fotones de alta energía son absorbidos por el  $\text{TiO}_2$  (band gap), y dependiendo de la fase cristalográfica del  $\text{TiO}_2$  se tiene una banda de máxima absorción: Anatasa 387 nm (3,2 eV) y rutilo 413 nm (3,0 eV). Cuando el fotocatalizador está irradiado con luz UV dichos fotones son absorbidos generando: electrones en la banda de conducción ( $e^-_{\text{CB}}$ ) y agujeros positivos en la banda de valencia ( $h^+_{\text{VB}}$ ):



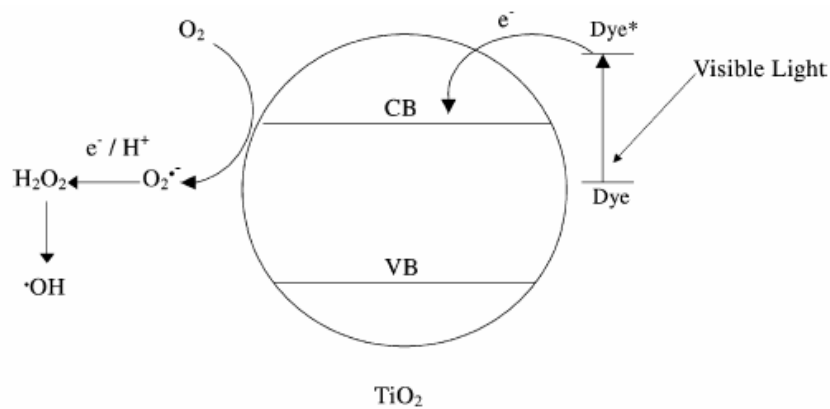
Los electrones inducen la reducción de moléculas, pero en presencia de oxígeno, ellos conducen a la formación de aniones superóxido. Los agujeros positivos son oxidados por las sustancias orgánicas adsorbidas o en medio acuoso reacciona con agua formando radicales hidróxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), los cuales son eficientes oxidantes (con un potencial de oxidación de 2,80V con respecto al electrodo normal de hidrógeno) (Krýsová et al, 2003).

Este semiconductor es comúnmente usado en fotocatalisis por su no toxicidad y disponibilidad comercial (Degussa P25), presenta una composición porcentual de 30% rutilo y 70% anatasa; donde esta última forma cristalina es la más fotoactiva (Rachel et al, 2002). El dióxido de titanio ha sido eficazmente utilizado en la esterilización fotocatalítica de bacterias, en la eliminación de microorganismos, en la limpieza y eliminación de contaminantes en utensilios domésticos. Lograron la oxidación total de la bacteria *Echerichia coli* por las especies reactivas de oxígeno generadas por las reacciones fotocatalíticas del  $\text{TiO}_2$ , las cuales producen diversos daños a los organismos vivos. Los trabajos de investigación sobre la muerte celular fotoinducida por el dióxido de titanio se han llevado a cabo sobre un amplio rango de organismos incluyendo virus, bacterias, hongos, algas y células cancerígenas. Sin embargo, las respuestas de los organismos vivos a estas reacciones catalíticas no han sido estudiadas en detalle y los mecanismos que conllevan a la muerte celular no han sido aun descifrados claramente. Si las partículas de dióxido de titanio son de tamaño nanométrico, ellas podrían penetrar en las células y el proceso fotocatalítico ocurre en el interior de la célula (Blake et al, 1999). Sorprendentemente muchos autores proponen métodos sencillos de obtener  $\text{TiO}_2$  de una variedad de tamaños de partícula; principalmente nanométricos, por procedimientos novedosos y de fácil elaboración en

el laboratorio (López et al, 2001 y Yu et al, 2001). El método sol-gel desde mediados del siglo XIX se ha usado en la generación de cerámicas inorgánicas y materiales vidriosos con una variedad de tamaños de partícula, que van desde macroscópicos hasta nanométricos (Hench & West, 1990).

La fotoactividad del dióxido de titanio está limitada a la región UV, y la energía solar no es suficiente porque solo el 5% de la luz del sol presenta una región UV. Además las fuentes comerciales necesitan lámparas con potencias muy altas lo cual es una desventaja en la aplicación del método fotocatalítico (Mele et al, 2002 y Ranjit et al, 1998). Luego se hace conveniente la sensibilización del  $\text{TiO}_2$  por un colorante; es decir extendiendo la capacidad de absorción de la luz visible por parte del  $\text{TiO}_2$  mediante la presencia dicho colorante (Oekermann, 2001 y Ranjit et al, 1998). Los sistemas del  $\text{TiO}_2$  sensibilizados han sido usados en celdas solares y en la degradación fotosensible de compuestos orgánicos (Lenzmann et al, 2001; Nazeeruddin et al, 2001; Haque et al, 2000 y Bach et al, 1998), y observándose un alto grado de actividad fotocatalítica (Leznoff et al, 1996 y Nazeeruddin et al, 1993). La fotoactividad se debe al fenómeno de transferencia de carga por parte del sensibilizador excitado a la banda de conducción del  $\text{TiO}_2$  (figura 20), permitiendo así la formación

de anión superóxido:  $O_2^{\bullet -}$  y radicales  $OH^{\bullet}$ , debido a la adsorción del  $O_2$  en la superficie del semiconductor o la presencia de un medio acuoso. Estas especies son capaces de oxidar sustratos orgánicos de su entorno inmediato (Yu et al, 2003; Cho & Choi, 2001 y San Roman, 1996).



**Figura 20.** Principio de fotosensibilización del  $TiO_2$  (Yu et al, 2003).

En este trabajo de grado se pretende estudiar el efecto fototóxico del dióxido de titanio sensibilizado con la TsPcCu sobre células HeLa. Para ello se realizó la preparación del  $TiO_2$  mediante un método sol-gel con el fin de obtener tamaños de partículas que faciliten su ingreso a la célula y observar el efecto fotodinámico de la TsPcCu anclada al  $TiO_2$  por irradiación con una fuente láser de una longitud de onda de 665 nm.

### 1.2.6. Luz

La luz es la parte activa de la TFD. Para ello se utilizan dos fuentes de luz: Luz normal y luz coherente monocromática. Muchas de las drogas fotosensibilizadoras, absorben en un amplio rango de longitudes de onda, por lo cual la luz monocromática, no se requiere. Es así como la coherencia de la luz producida por fuentes láser no es una ventaja para la TFD, y en este sentido la aplicación de las fibras ópticas no son rigurosamente necesarias, mientras que las fuentes de luz normal las cuales producen anchas regiones de emisión de luz podrían ser más apropiadas (Brown et al, 1999).

Las únicas opciones de fuentes láser disponibles eran láseres de colorante de argon y cobre, difícilmente transportables y además costosas. Actualmente, se conocen una nueva generación de equipos láser, como los que se observan en la figura 21, que han revolucionado la escena de la TFD. Estos son estables, fiables y económicamente disponibles, por consiguiente muy prácticos para su uso clínico, ya que para el tratamiento con un sensibilizador en particular estos son extremadamente convenientes (Brown et al, 1999).

Se ha venido incrementando la utilidad de las fuentes no láser en TFD, especialmente en aplicaciones dermatológicas y otros tipos de tratamientos donde el uso de las fibras con radiación limitada no es

requerido, como por ejemplo en el tratamiento del cáncer de cérvix. Esas fuentes generalmente son más económicas que los láseres (Brown et al, 1999).



**Figura 21.** Fuente láser disponible en el laboratorio.

La luz láser utilizada en la TFD es diferente a la luz solar por que es enfocada en lugar de difundirse. En la TFD clínica con Photofrin<sup>®</sup> son requeridos típicamente flujos de 50-500 J/cm<sup>2</sup> de luz roja. No obstante con la utilización de nuevos sensibilizadores más eficientes, se requiere flujos mas pequeños (~10 J/cm<sup>2</sup>) (Dougherty et al, 1998).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad fototóxica de la tetrasulfoftalocianina de cobre anclada en nanopartículas de óxido de titanio sintetizado por el método de sol-gel (TSPcCu–TiO<sub>2</sub>) sobre el crecimiento *in vitro* de células humanas de cáncer de cerviz (células HeLa).

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Probar el efecto fototóxico de la TSPcCu sobre la viabilidad y concentración de células HeLa crecidas *in-vitro*.
- Aprender el efecto potenciador del TiO<sub>2</sub> sobre la actividad fototóxica de la TSPcCu.
- Comparar el efecto fototóxico entre la tetrasulfoftalocianina de cobre soportada y no en TiO<sub>2</sub> en nanopartículas sobre el crecimiento *in vitro* de células HeLa.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### Materiales y reactivos

- La tetrasulfoftalocianina de cobre (TsPcCu); se obtuvo de la casa comercial ALDRICH.
- El TiO<sub>2</sub> se sintetizó por un método *sol-gel* como se describe más adelante usando los siguientes reactivos:

2-propanol y el ácido nítrico al 65%. que se adquirieron de la casa comercial MERK.

Terbutoxido de titanio (IV) (Ti(OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>4</sub>).al 97%, en 2-propanol se obtuvo de la casa comercial ALDRICH.

Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) se adquirió en la casa comercial (ACS)

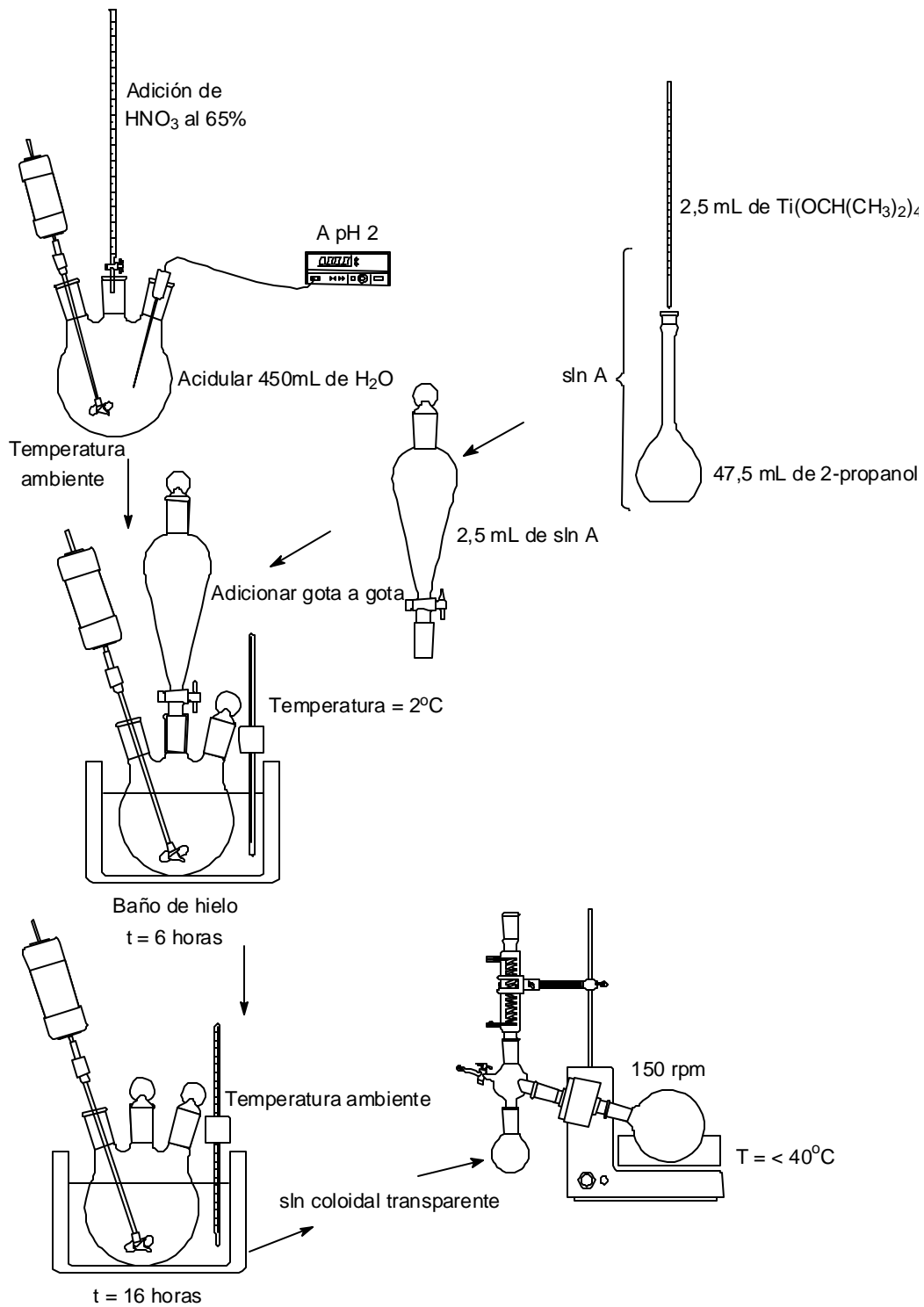
- La línea celular HeLa (células de carcinoma humano de cérvix) fue otorgada generosamente por la Doctora Maria Mercedes Bravo del Instituto Nacional de Cancerología en Bogotá. Las células fueron mantenidas en medio RPMI-1648 suplementado con suero bovino fetal (SBF) 10%.

#### **3.1. SÍNTESIS DEL DIÓXIDO DE TITANIO**

Para la síntesis del TiO<sub>2</sub> se usó un método *sol-gel*; cuyo protocolo se obtuvo de los originalmente propuestos por Weng et al, (2000) y

O'Regan et al, (1990), con lo que se esperó obtener un tamaño de partícula lo suficientemente pequeño como para que se facilite su ingreso a las células. En la figura 22 se ha indicado un esquema resumido del proceso de síntesis seguido para la preparación del  $\text{TiO}_2$ , el cual se describe a continuación.

Se acidularon 900 mL de agua destilada hasta pH 2 con ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) al 65% y se llevó la mezcla a  $2^\circ\text{C}$ . Luego se adicionaron gota a gota 5 mL de una solución  $\text{Ti}(\text{OCH}(\text{CH}_3)_2)_4$  en 2-propanol con una relación molar 1:19; mientras se agitó vigorosamente a 2000 rpm. La agitación (2000 rpm) y la temperatura ( $2^\circ\text{C}$ ) se mantuvieron constantes durante un periodo de 6 horas. La solución coloidal formada se secó en el rotoevaporador a una temperatura menor de  $40^\circ\text{C}$  y 150 rpm.



**Figura 22.** Procedimiento usado para de la síntesis del  $\text{TiO}_2$

### **3.2. ANCLAJE DE LA TETRASULFOFTALOCIANINA DE COBRE AL DIÓXIDO DE TITANIO**

Para el anclaje de la TsPcCu al TiO<sub>2</sub> se modificaron protocolos inicialmente descritos para el anclaje de colorantes como la TsPcCu y el Fe<sup>III</sup>(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup> al TiO<sub>2</sub>, publicados originalmente por Yu et al, (2003); y Weng et al (2000) respectivamente. Brevemente: 1,5x10<sup>-5</sup> g de TsPcCu y 0,03 g de TiO<sub>2</sub> se mezclaron en proporción peso a peso 1:199, en 25 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 M. Dicha mezcla se agitó vigorosamente (1500 rpm) durante tres horas a temperatura ambiente. Posteriormente se dejó decantar el precipitado formado para finalmente lavarlo con 25 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1M y agua destilada tres veces: El precipitado obtenido se secó en el rotoevaporador a 40° C y 150 rpm

### **3.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS**

Con el fin de determinar la autenticidad de los compuestos, la caracterización se llevó a cabo haciendo uso de los métodos instrumentales tales como: difracción de rayos X, espectroscopia UV-VIS e infrarroja.

### **3.3.1. Difracción de rayos X**

Con este estudio se pretendió tener una estimación del tamaño de partícula del  $\text{TiO}_2$  y obtener información a cerca de la cristalinidad tanto del  $\text{TiO}_2$  como de la  $\text{TsPcCu-TiO}_2$ .

Para este proceso se maceró la muestra en un mortero de ágata y el espécimen seleccionado de la muestra fue colocado en un portamuestra ZBH (Zero Background Holder) bajo las condiciones de medición descritas en el siguiente listado:

Voltaje	40(kV)
Corriente	20 (mA)
Rendijas (Slits) DS	1.0°
RS	0,3 mm
SS	1.0°
Velocidad de Barrido	3°/min
Muestreo	0,02°
Rango de medición	2 – 70°
Radiación	CuK $\alpha$
Monocromador	Grafito
Difractómetro	Rigaku modelo D-MAX-III/B

### **3.3.2. Espectroscopia de absorción molecular ultravioleta/visible (UV-VIS)**

Este análisis se realizó con el objeto de medir la absorción de radiación ultravioleta y/o visible de los fotosensibilizadores esperando una fuerte banda alrededor de los 665 nm ya que el láser utilizado irradia a esta longitud de onda.

La TsPcCu se solubilizó en mL de PBS 1X a una concentración de 68  $\mu\text{M}$ , y se determinó el espectro con ayuda del espectrofotómetro HEWLETT-PACKARD UV-VIS modelo 8453.

Para el espectro UV-VIS de la TsPcCu-TiO<sub>2</sub> y del TiO<sub>2</sub> se usó el espectrofotómetro de UV-VIS PERKIN ELMER, Lambda 4B y se hizo necesario el uso de la reflectancia difusa; método que permite determinar el espectro UV-VIS de compuestos en fase sólida. Aunque en este caso las bandas de absorción no se logran tan definidas.

### ***3.3.3. Espectroscopia de absorción en el infrarrojo (IR)***

Mediante este análisis se procuró mostrar las bandas de absorción características de los fotosensibilizadores. Esperando de manera especial evaluar el anclaje de la TsPcCu en el TiO<sub>2</sub>.

Los sensibilizadores se analizaron en forma de pastilla con bromuro de potasio en un espectrómetro BROKER, en el rango de 4000 500  $\text{cm}^{-1}$ .

### **3.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOTÓXICA**

#### **3.4.1. Curva de crecimiento celular HeLa**

En placas de poliestireno de 24 pozos (FALCON); se sembraron 60 000 células/pozo en un mililitro de RPMI suplementado con suero bovino fetal al 10% (GIBCO). Las placas fueron incubadas a 37° C en atmósfera de CO<sub>2</sub> (5%) en una incubadora (HEPA FILTER) y cada 12 horas hasta completar 96, se determinó la concentración celular. Para esto las células se desprendieron con tripsina (5 min; 37° C), se concentraron por centrifugación (8 min; 2000 rpm) y el botón se resuspendió en un volumen de RPMI. Cada conteo se realizó por duplicado en una cámara de Neubauer (usando los cuatro cuadrantes de las esquinas) con un Microscopio NIKON (modelo ECLIPSE E400) con un lente de 10x. La viabilidad celular se determinó con la técnica de azul de tripan al 0,4% (El azul tripan es un coloide que se introduce en el interior de las células muertas. Así pues las células teñidas de color azul, fueron consideradas no viables).

La densidad celular (Número de células totales/mL) y viabilidad celular (porcentaje de células vivas) se graficaron versus tiempo para establecer la velocidad de crecimiento de la línea celular en las condiciones establecidas. A partir de estas se determinaron: los

tiempos de incubación, adición de los fotosensibilizadores y sometimiento de los cultivos a irradiación luego de la siembra.

#### **3.4.2. Evaluación del efecto fototóxico de los compuestos**

Los efectos fototóxico (efecto citotóxico que el sensibilizador induce en presencia de luz y oxígeno) y tóxico (efecto que produce el fotosensibilizador en ausencia de la luz) fueron establecidos en dos categorías:

- a) Inhibición del proceso de división celular (disminución de la densidad celular (No. de células/mL) en relación con el control negativo).
- b) Viabilidad celular (disminución del porcentaje de células vivas con respecto al control negativo). Que da una estimación del efecto letal que producen los compuestos sobre los cultivos celulares.

Soluciones patrón de 280 µg/mL TsPcCu, TiO<sub>2</sub> y TsPcCu–TiO<sub>2</sub> fueron preparadas en PBS 1X y esterilizadas en autoclave durante 15 minutos a 140° C y 15 lb de presión.

Se sembró una placa de 24 pozos, con 60 000 células/pozo. Pasadas 24 horas a 37° C, bajo atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, cada pozo se lavó dos veces con 1 mL de PBS 1X. Se administró 1mL de las soluciones con

concentraciones de 10, 9.95 y 0,05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de TsPcCu-TiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, y TsPcCu respectivamente que corresponden al porcentaje peso a peso de la TsPcCu y el TiO<sub>2</sub> en la TsPcCu-TiO<sub>2</sub>. Estas se prepararon a partir de las soluciones patrón, diluidas con medio de crecimiento estéril (RPMI al 10% en suero bovino fetal). La figura 23 indica la distribución de los fármacos en la placa. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Todos compuestos se dejaron incubar en las mismas condiciones durante 7 horas. Al término de estas los cultivos celulares fueron lavados dos veces con 1mL de PBS y se adicionó 1mL de RPMI al 10% por pozo. Seguidamente, la placa fue irradiada por un periodo de una hora (figura 21) con una fuente Láser (MARCA B & W TEK, modelo BFW-670-300) a una longitud de onda de  $\sim 665 \text{ nm}$  (Anexo 1), la intensidad del haz fue de  $10\text{J}/\text{cm}^2$  y la distancia de 35 cm (Distancia mínima requerida para que la radiación emitida por la fuente abarque toda la placa). La placa se llevó a incubación a 37° C y con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. La actividad de los fotosensibilizadores se determino a las 12, 18 y 24 horas pos-irradiación, mediante el procedimiento descrito en el numeral 3.4.1., para realizar las curvas de densidad celular (Número total de células/mL), y viabilidad celular (Porcentaje de células vivas por pozo).

Tiempo (horas post-irradiación)	12		18		24	
	C-	C-	C-	C-	C-	C-
	TSPcCu-TiO <sub>2</sub>	TSPcCu-TiO <sub>2</sub>	TSPcCu-TiO <sub>2</sub>	TSPcCu-TiO <sub>2</sub>	TSPcCu-TiO <sub>2</sub>	TSPcCu-TiO <sub>2</sub>
	C <sub>TiO<sub>2</sub></sub>	C <sub>TiO<sub>2</sub></sub>	C <sub>TiO<sub>2</sub></sub>	C <sub>TiO<sub>2</sub></sub>	C <sub>TiO<sub>2</sub></sub>	C <sub>TiO<sub>2</sub></sub>
	C <sub>TSPcCu</sub>	C <sub>TSPcCu</sub>	C <sub>TSPcCu</sub>	C <sub>TSPcCu</sub>	C <sub>TSPcCu</sub>	C <sub>TSPcCu</sub>

**Figura 23.** Distribución de fármacos en placas de 24 pozos. C-:control negativo; pozos sin novedad (1mL de RPMI 10%). C<sub>TSPcCu</sub> es el control para la tetrasulfoftalocianina de cobre. C<sub>TiO<sub>2</sub></sub> es el control para el TiO<sub>2</sub>.

### 3.4.3. Evaluación del efecto tóxico de los compuestos

Para comprobar el efecto tóxico de la luz y de los fotosensibilizadores se utilizó el mismo procedimiento descrito para evaluar la actividad fototóxica (numeral 3.4.2), los experimentos se hicieron simultáneamente con la diferencia, que los cultivos tratados con los compuestos no fueron irradiados. La distribución de los fotosensibilizadores fue también la misma que se muestra en la figura 23.

### 3.4.4. Análisis estadístico

Para establecer el efecto de los tratamientos y determinar la no presencia de errores experimentales apreciables durante el proceso, se

compararon los valores de densidad y viabilidad celular entre el control negativo, la TsPcCu, la TsPcCu-TiO<sub>2</sub> y el TiO<sub>2</sub> de cultivos tratados con luz y de estos con los no tratados. La significancia de las diferencias se estableció usando análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Kruskal-Wallis, dependiendo si los datos eran o no paramétricos. Cuando se obtuvieron diferencias significativas, se utilizó la prueba a posteriori de Scheffé, que permite identificar entre que datos se encuentran dichas diferencias. Para estos análisis se empleó el programa Statistica v 5.1 (Statsoft, 1996).

En el análisis estadístico se consideraron diferencias significativas para  $p < 0.05$ ; donde  $p$  es la probabilidad. Aunque el número de réplicas es pequeño ( $n=3$ ) para la realización del análisis estadístico se asumió la normalidad de los datos.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS

#### 4.1.1. Síntesis y caracterización del $TiO_2$

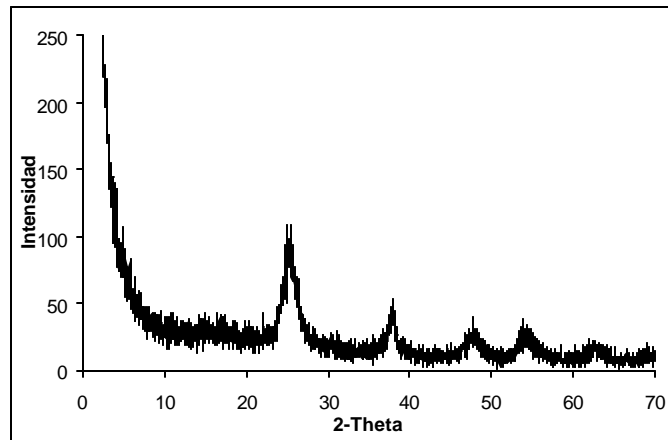
El procedimiento empleado para la síntesis del  $TiO_2$  por el método *sol-gel* descrito en el numeral 3.1; produjo un rendimiento del 97.8% de un sólido color crema insoluble tanto en agua como en PBS 1X aún después de llevar las mezclas a ultrasonido durante una hora.

El porcentaje de rendimiento del  $TiO_2$  sintetizado fue alto, pero no obstante la cantidad obtenida es baja con relación al tiempo prolongado que se empleó en el secado del compuesto debido a la baja temperatura (40° C) de rotoevaporación que se requiere para obtener pequeños tamaños de partículas. Lo que se puede perfeccionar con mejores condiciones de vacío.

#### Difracción de rayos x

Según el análisis del perfil de difracción del  $TiO_2$  (figura 24) se concluye que la forma cristalográfica predominante es la anatasa; debido a que presenta los picos correspondientes a las distancias cristalinas típicas de dicha fase, aunque con un bajo grado de cristalinidad (Yu et al, 2001).

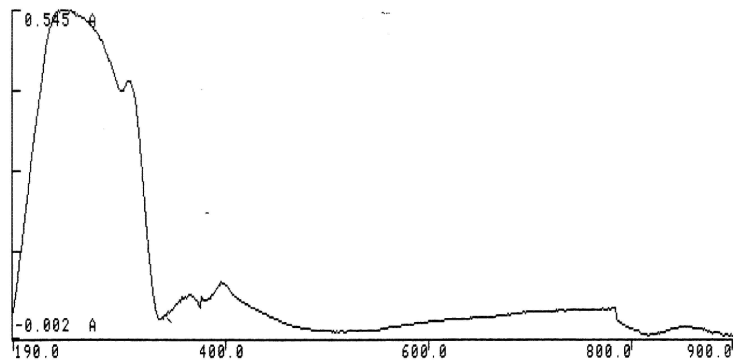
Además de obtener la forma cristalina más activa del  $\text{TiO}_2$  (Anita Rachel, 2002). También, se podría sugerir la obtención de pequeños tamaños de partículas, basándose en los anchos de las bandas del difractograma.



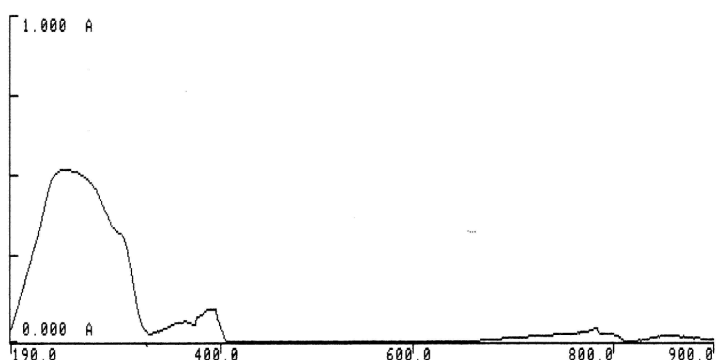
**Figura 24.** Difractograma de rayos X del  $\text{TiO}_2$  sintetizado

#### Espectroscopia de absorción molecular ultravioleta/visible (UV-Vis)

En la figura 25 se indica el espectro UV-Vis del  $\text{TiO}_2$ , observándose una banda muy fuerte en 244 nm y otra de menor intensidad en 396 nm (bandas en el UV), características del material, y un pequeño pico alrededor de 400 nm. En la figura 26 se observa el espectro UV-Vis del  $\text{TiO}_2$  Degussa Huls (comercial), observándose las mismas características espectrales.



**Figura 25.** Espectro de reflectancia difusa de absorción molecular ultravioleta visible del TiO<sub>2</sub> sintetizado por un método sol gel.



**Figura 26.** Espectro de reflectancia difusa de absorción molecular ultravioleta visible del TiO<sub>2</sub> Degussa Huls (comercial)

Espectroscopia de absorción en el infrarrojo (IR)

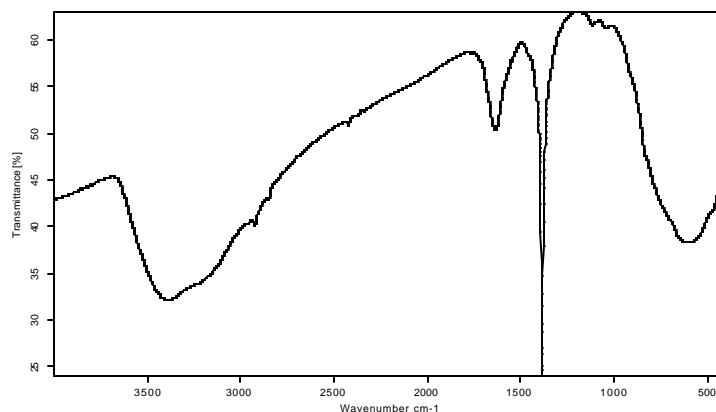
El espectro IR (figura 27), corrobora la presencia de la fase anatasa por la banda situada en 608 cm<sup>-1</sup> característica de tensión Ti-O. Además, se distinguen los picos en 3443 cm<sup>-1</sup> de la tensión del grupo O-H debida a la humedad del compuesto o a la presencia de grupos hidroxilo

superficiales del  $\text{TiO}_2$  que se corrobora con la banda que aparece en  $1600 \text{ cm}^{-1}$  de la flexión del O-H (Ti-OH) (Tabla 1).

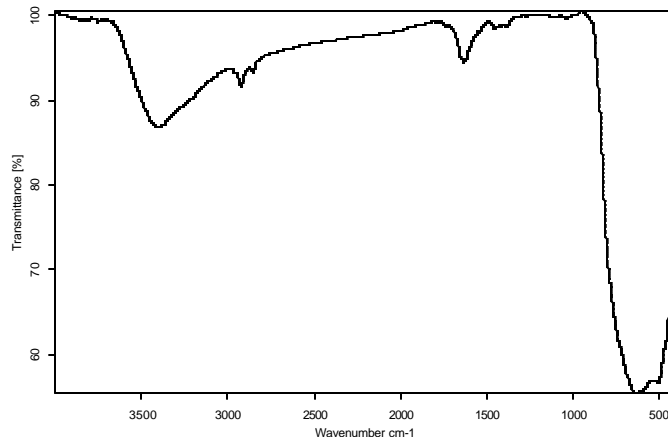
**Tabla 1.** Asignación de las principales bandas de absorción de los espectros infrarrojos del  $\text{TiO}_2$  sintetizado y comercial.

Tipo de vibración	Frecuencia ( $\text{cm}^{-1}$ )	$\text{TiO}_2$ sintetizado	$\text{TiO}_2$ comercial
Tensión Ti-O (anatasa)	608	v	v
Flexión C-C-H	1070	v	-
Tensión C-C	1145	v	-
Deformación C-H	1384	v	-
Flexión O-H	1600	v	v
Tensión sim y asim, C-H	2900	v	v
Tensión O-H	3443	v	v

v presente; -ausente.



**Figura 27.** Espectro de absorción molecular en el infrarrojo del  $\text{TiO}_2$  sintetizado.



**Figura 28.** Espectro de absorción molecular en el infrarrojo del TiO<sub>2</sub> P25 Degussa Hulls (comercial)

Al comparar el espectro IR con el del TiO<sub>2</sub> Degussa (figura 28) se observan las bandas mencionadas. Incluyendo un doblete en 2900 cm<sup>-1</sup> que también aparecen en ambas muestras, debido a las vibraciones de tensión asimétrica y simétrica del C-H. La diferencia está en una banda muy pronunciada en 1384 cm<sup>-1</sup> y dos bandas de absorción en 1145 y 1070 cm<sup>-1</sup> correspondientes a la tensión del enlace C-C y flexión del C-C-H, lo cual se atribuye a la presencia de grupos isopropilo adheridos a la superficie. La manifestación de estas bandas posiblemente se debe a la no calcinación del producto final, la cual no se realizó para evitar la obtención de mayores tamaños de partícula. Aunque inicialmente no se esperaba la existencia de dichos grupos “superficiales”, se ha propuesto que la presencia de grupos metoxi parece ser beneficiosa para la localización del fotosensibilizador en el

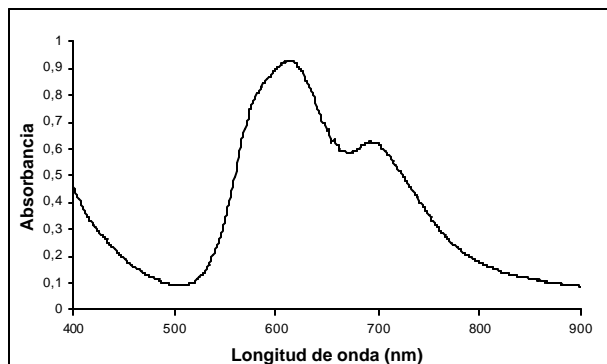
tumor (Yslas, 2005). La naturaleza química del grupo isopropoxi ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHO) es semejante a la del metoxi (CH<sub>3</sub>O).

#### **4.1.2. Caracterización de la tetrasulfoftalocianina de cobre**

La muestra comercial se caracteriza por ser un polvo de color azul, que presenta alta solubilidad en agua destilada y PBS 1X

##### *Espectroscopia de absorción molecular ultravioleta/visible (UV-VIS)*

El espectro UV-Vis de la TsPcCu (figura 29) presenta las bandas Q (600-650 nm) y Soret (650-750 nm) de absorción características de las ftalocianinas. Aunque las bandas de máxima absorción son anchas revelando así la posible formación de agregados, característico del compuesto, cuando se usó PBS 1X con suero bovino fetal al 10% se produjo una solución más estable para tiempos prolongados de conservación, además de una delimitación y aumento de la intensidad de las bandas de absorción, debido a que las Pc son preferiblemente enlazadas a las lipoproteínas del suero (Yslas. I., 2005).

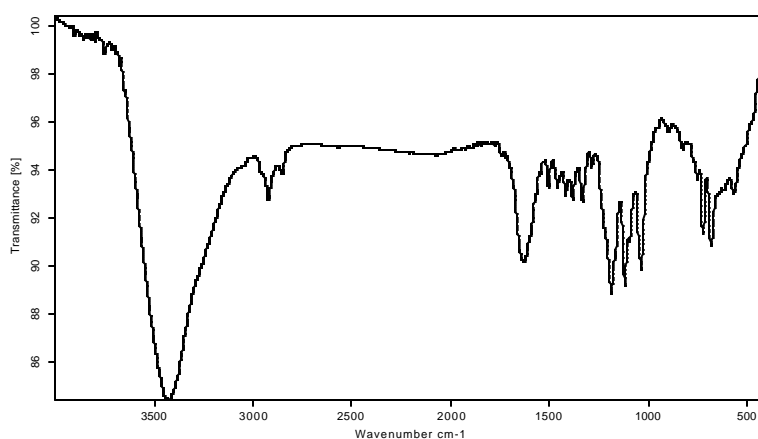


**Figura 29.** Espectro de absorción molecular UV-VIS de la TsPcCu en PBS 1X a una concentración de 68  $\mu\text{M}$ .

### Espectroscopia de absorción en el infrarrojo (IR)

El espectro infrarrojo de la TsPcCu obtenida comercialmente (figura 30), muestra las bandas de absorción asociadas a las unidades estructurales de dicha molécula. En la región de  $3425\text{ cm}^{-1}$  se observa una ancha banda de tensión del grupo O-H debida a la humedad de la muestra. Se observan tres bandas próximas a  $2924\text{ cm}^{-1}$  características a la vibración de tensión del =C-H, junto con las vibraciones del C=C en  $1635\text{ cm}^{-1}$ , características de las estructuras aromáticas. También se aprecia la banda debida a las vibraciones de flexión C-H fuera del plano en  $683\text{ cm}^{-1}$ , y las vibraciones de flexión en el plano que dan lugar a absorciones entre  $1507$  a  $1384\text{ cm}^{-1}$ . En la región de  $700$  a  $590\text{ cm}^{-1}$  aparece la absorción de tensión C-S, que cuando el átomo de azufre está unido directamente a un grupo fenilo como es el caso, absorbe en  $723\text{ cm}^{-1}$ . Finalmente aparecen tres

bandas debidas a las vibraciones de tensión del grupo S=O en la región de 1189 a 1136  $\text{cm}^{-1}$ , características de los ácidos sulfónicos ( $-\text{SO}_3\text{H}$ ) cuyo enlace S=O posee un considerable carácter de enlace sencillo donde la banda más intensa es la de mayor frecuencia (Tabla 2).

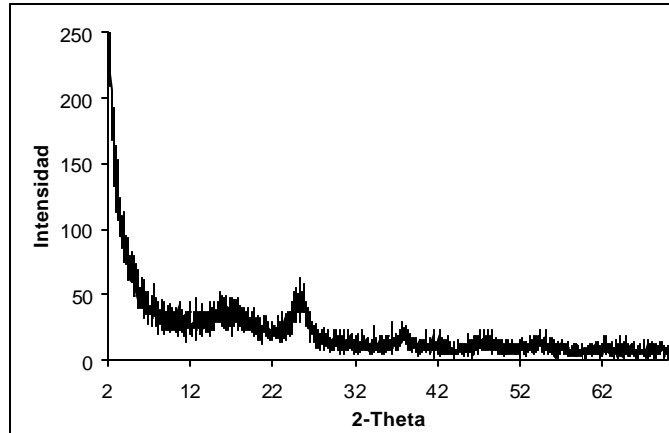


**Figura 30.** Espectro de absorción molecular en el infrarrojo de la TsPcCu (Comercial)

#### ***4.1.3. Anclaje de la tetrasulfoftalocianina al dióxido de titanio y caracterización***

El sólido obtenido presentó una coloración azul celeste; la cual prevé la presencia del colorante en el  $\text{TiO}_2$ . Al igual que este, presentó nula solubilidad en agua destilada y PBS 1X, aun después de ser llevada a ultrasonido durante 1 hora.

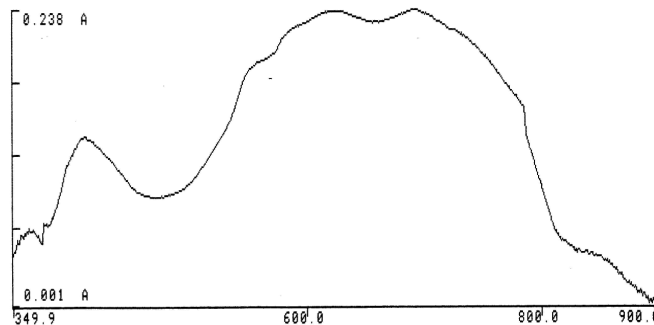
## Difracción de rayos X



**Figura 31.** Difractograma de rayos X del  $\text{TiO}_2$  sintetizado y sensibilizado con TsPcCu al 0,5% p/p

En el difractograma de la TsPcCu -  $\text{TiO}_2$  (figura 31) se observa la presencia de la anatasa como única forma alotrópica del  $\text{TiO}_2$  sintetizado ( $2\theta = 25.2$ ), aun después del anclaje, aunque se ha perdido cristalinidad.

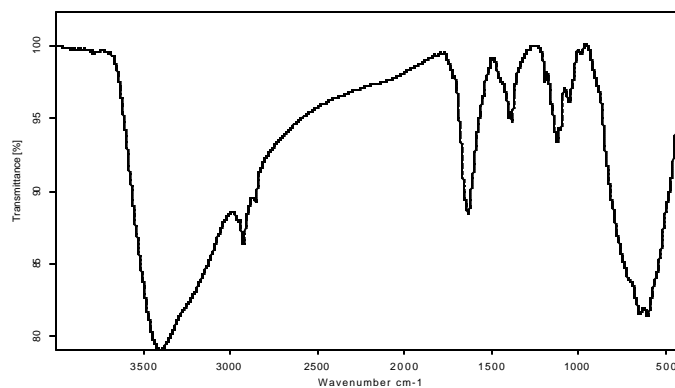
## Espectroscopia de absorción molecular UV-VIS



**Figura 32.** Espectro de reflectancia difusa de absorción molecular ultravioleta visible del  $\text{TiO}_2$  sintetizado y sensibilizado con TsPcCu al 0,5% p/p.

En el espectro de reflectancia difusa UV-VIS de la TsPcCu - TiO<sub>2</sub> (figura 32) se observa la presencia de una banda alrededor de 400 nm característica del soporte (TiO<sub>2</sub>) y de una amplia banda entre 500 y 800 nm, en la cual se pueden apreciar dos valores de máxima absorción, que se pueden asociar a las bandas características (soret y Q) de la tetrasulfoftalocianina de cobre, que se encuentran en este rango de longitudes de onda, ver figura 29, lo cual favorece la realización de este trabajo ya que el láser usado para irradiar las células tiene una longitud de onda de 665 nm, valor que se encuentra entre los dos máximos (617 y 697 nm) de las bandas en la región visible de la TsPcCu. Para lograr la máxima capacidad del fotosensibilizador lo ideal sería disponer de un láser que irradie a una de las longitudes de onda mencionadas.

### Espectroscopia de absorción en el infrarrojo (IR)



**Figura 33.** Espectro de absorción molecular en el infrarrojo de TiO<sub>2</sub> sintetizado y sensibilizado con TsPcCu al 0,5% p/p.

En el espectro de IR de la TsPcCu-TiO<sub>2</sub>, figura 33, se puede concluir la presencia de humedad debido a la ancha banda de absorción que se encuentran en la región comprendida entre 3350 y 3550 cm<sup>-1</sup>. Humedad que en la TsPcCu se atribuye a la humedad del ambiente retenida, mientras en el espectro IR de la TsPcCu-TiO<sub>2</sub> se suma la presencia de los grupos OH de la superficie del TiO<sub>2</sub>. Además, así como las bandas de absorción en 1189, 1119 y 1037 cm<sup>-1</sup> propias de la TsPcCu y características del grupo -SO<sub>3</sub> de las vibraciones de tensión del grupo S=O, se observan en el espectro IR. En esta misma región del espectro de absorción de la TsPcCu-TiO<sub>2</sub> es evidente la localización de estas bandas, así como el cambio tanto en la morfología como en la intensidad de las bandas lo que permite suponer el anclaje de la TsPcCu al TiO<sub>2</sub>. Por otra parte, la banda de tensión C-S y de la flexión C-H fuera del plano se ven solapadas por la ancha banda de tensión del Ti-O en 604 cm<sup>-1</sup>. Las bandas de flexión C-H en el plano propias de compuestos aromáticos, que dan lugar a absorciones entre 1275 y 900 cm<sup>-1</sup>, se encuentran solapadas por la del isopropilo en 1384 cm<sup>-1</sup>. Finalmente las bandas localizadas alrededor de 2925 cm<sup>-1</sup> correspondientes a las vibraciones de tensión C-H de la TsPc y la banda en 1637 cm<sup>-1</sup> propia del estiramiento C=C y C=N se observan sin cambio en el espectro IR del material obtenido (tabla 2)

**Tabla 2.** Principales bandas de absorción en el infrarrojo de la TsPcCu anclada al TiO<sub>2</sub>, comparándolas con las bandas de absorción de la TsPcCu.

Tipo de vibración	Frecuencia (cm <sup>-1</sup> )	TsPcCu	TsPcCu-TiO <sub>2</sub>
Tensión O-H	3425	v	v
Tensión =C-H	2924	v	v
Estiramiento C=C y C=N	1635	v	v
Flexión C-H en el plano (aromático)	1507 a 1333	v	-
Tensión sim. S=O	1189	v	v
Estiramiento asim. S=O	1118	v	v
Tensión S-O	1036	v	v
Tensión C-S	723	v	-
Flexión C-H fuera del plano (aromático)	683	v	-

v presente; – ausente

#### 4.2. EVALUACIÓN *IN-VITRO* DE LA ACTIVIDAD FOTOTÓXICA DE LOS COMPUESTOS

Cabe recordar que para la determinación de las actividades tóxica y fototóxica de los compuestos se realizaron los experimentos por triplicado. Estos se denotan en las tablas 3 y 4 como experimento 1, 2 y 3. Para el caso de la densidad celular existen diferencias significativas entre los tres experimentos con  $p=0.000$ , por lo que se procedió a realizar la prueba de Scheffé encontrando diferencias entre el experimento 1 con relación al 2 y 3, lo cual no es difícil de esperar puesto que el experimento 1 se comenzó con un número mayor de

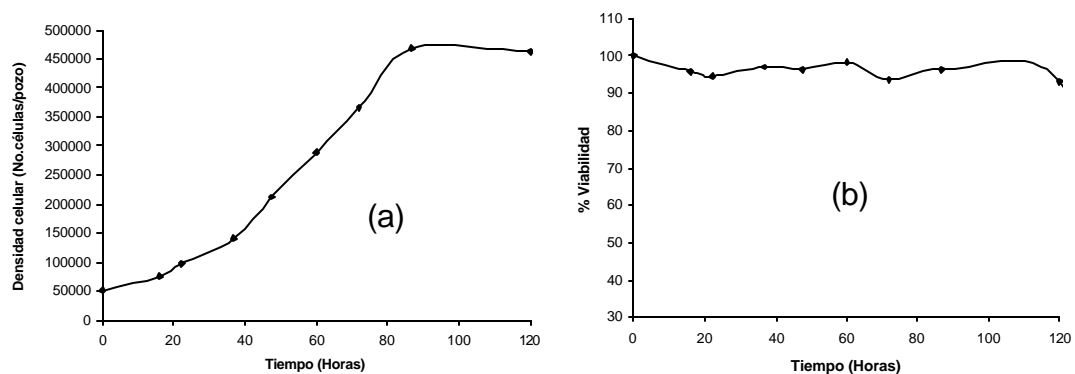
células. Sin embargo, se aclara que el comportamiento de los tres experimentos en el transcurso de las horas es el mismo, encontrando de igual manera un mayor número de células a las 24 horas en el experimento 1 con respecto a los 2 y 3, motivo por el cual no se eliminó ningún experimento para obtener el promedio.

El tratamiento estadístico de los tres ensayos para los resultados de porcentajes de viabilidad celular no mostró diferencia significativa con  $p= 0.818$  lo que indica la reproducibilidad y en caso tal la confiabilidad de los resultados.

#### ***4.2.1. Curva de crecimiento celulas HeLa***

La figura 34 (a) indica la curva de crecimiento de las células HeLa que se inició con 50 000 células/mL. Revela un aumento de la densidad celular hasta las 90 horas de incubación, posteriormente se observa una región en la cual la cantidad de células es constante. Es una curva característica de crecimiento con las etapas habituales: crecimiento exponencial y meseta de la densidad celular. La viabilidad de las células se mantuvo constante en los tiempos de incubación (figura 34 (b)). Con estas gráficas se pretendió garantizar que la muerte celular se deba a la actividad de los compuestos y no de otros factores externos tales como: muerte por envejecimiento o por escasez de

nutrientes. Además permiten corroborar el crecimiento normal del cultivo y concertar los tiempos de adición e internalización de los fármacos para la posterior irradiación láser, de modo que estos no superen las 90 horas.



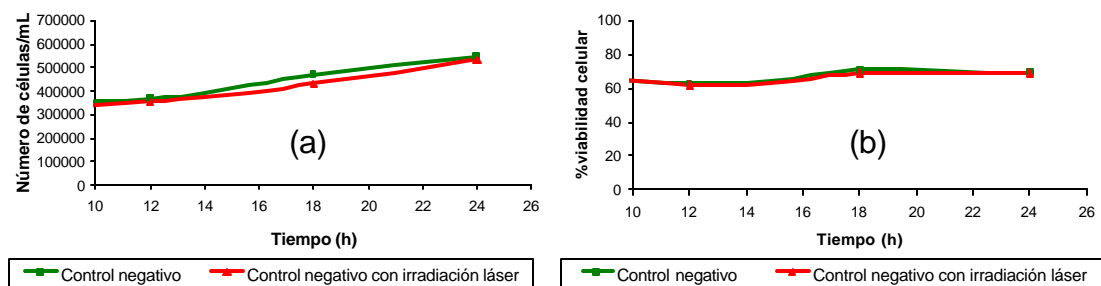
**Figura 34.** Curva de crecimiento células HeLa, crecidas en placas de 24 pozos, suspendidas en 1 mL de RPMI suplementado con suero bovino fetal al 10% (a) Densidad celular y (b) porcentaje de viabilidad.

#### **4.2.2. Efecto de la distancia y tiempo de irradiación**

La distancia de irradiación fue de 35 cm (distancia mínima que garantiza la irradiación de toda la placa de 24 pozos). La irradiación de los cultivos celulares se llevo a cabo durante una hora, con intensidad de  $10 \text{ J/cm}^2$ . Las figuras 35 (a) y 35 (b) certifican que bajo dichas condiciones la radiación por si misma no produce efecto alguno sobre los cultivos celulares, ya que no se observa una disminución

significativa en la densidad celular ni en el porcentaje de viabilidad con respecto a la placa no irradiada.

Por otra parte los resultados del análisis estadístico para los controles negativos (irradiación láser, no irradiación láser) tanto en densidad celular como en porcentaje de viabilidad permiten reiterar que para las condiciones de distancia y tiempo de irradiación utilizadas no se encontró efecto apreciable con  $p = 0.175$  y  $0.317$  respectivamente.



**Figura 35.** Efectos de la distancia, tiempo e intensidad de irradiación sobre: (a) el crecimiento y (b) viabilidad de células HeLa.

#### **4.2.3. Efecto toxico de los compuestos**

En las tablas 3 se presentan los resultados de tres experimentos realizados bajo las mismas condiciones para evaluar la actividad de los compuestos en la oscuridad a las 12, 18 y 24 horas postratamiento .

La figura 36 muestra el promedio de tres experimentos indicados en la tabla 3 para comparar los efectos tóxicos que se observaron para la TsPcCu-TiO<sub>2</sub> y los respectivos controles. En estos ensayos realizados en ausencia de luz se pueden considerar los siguientes comportamientos: El TiO<sub>2</sub> inhibe el crecimiento celular a las 12, 18 y 24 horas. La TsPcCu ayuda al incremento de la densidad celular a las 12 y 18 horas, lo cual indicaría que hasta este tiempo dicho compuesto da paso a mayor velocidad de replicación, pero a las 24 horas se observa una inhibición del crecimiento. Mientras que el compuesto TsPcCu-TiO<sub>2</sub> evidencia un comportamiento intermedio, en especial una disminución de la densidad celular a las 18 horas (figura 36 (a)). Sin embargo la probabilidad de que haya significancia en estas diferencias fue de 0.886.

Finalmente la figura 36 (b), resalta el hecho que ninguno de los fotosensibilizadores a las 12, 18 y 24 horas postratamiento, producen disminución del porcentaje de viabilidad alguno en la oscuridad sobre los cultivos celulares ( $p = 0.488$ ).

**Tabla 3. Efecto tóxico de los compuestos sobre el crecimiento (No.) y la viabilidad (V) de células Hela.**

12 horas de tratamiento						
Compuestos	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
	No.	V (%)	No.	V (%)	No.	V (%)
TiO <sub>2</sub> -TsPcCu <sup>a</sup>	423000	64,40	322000	64,13	346500	67,00
TiO <sub>2</sub> <sup>b</sup>	448000	57,81	263800	59,10	259000	60,81
TsPcCu <sup>c</sup>	490500	71,30	318500	67,60	331500	65,40
Medio(control)	483000	65,22	308000	60,46	311500	62,70

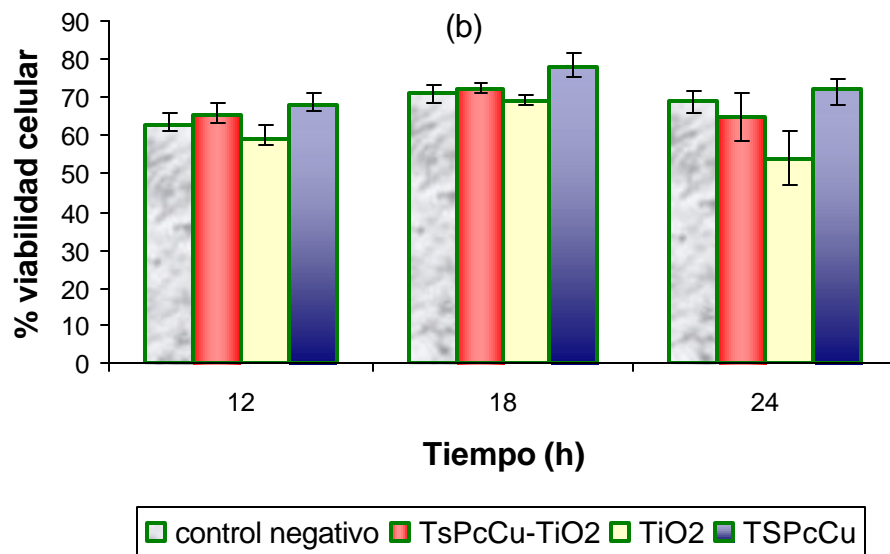
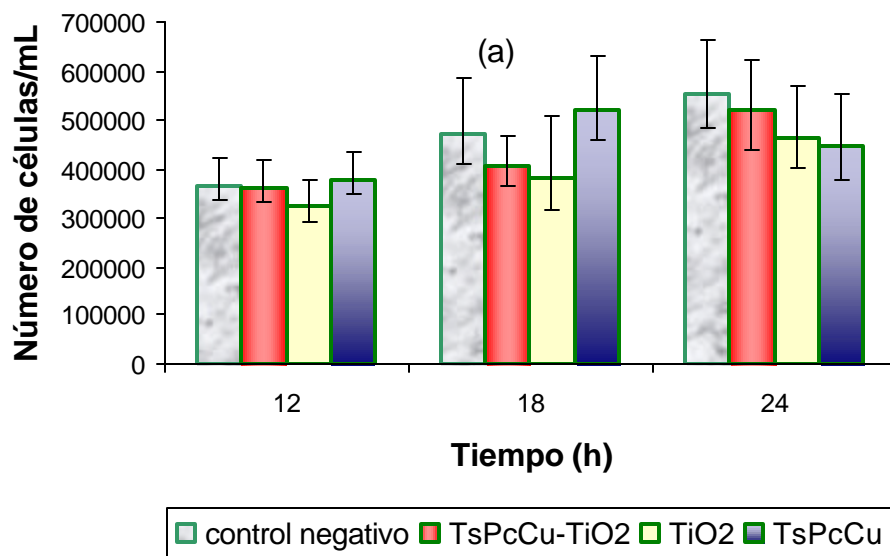
18 horas de tratamiento						
Compuestos	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
	No.	V (%)	No.	V (%)	No.	V (%)
TiO <sub>2</sub> -TsPcCu <sup>a</sup>	510000	66,00	326000	72,22	389000	78,36
TiO <sub>2</sub> <sup>b</sup>	490000	62,16	340000	66,70	320000	68,80
TsPcCu <sup>c</sup>	630500	79,63	453000	80,90	482500	74,00
Medio(control)	582000	73,68	427000	68,03	406000	71,40

24 horas de tratamiento						
Compuestos	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
	No.	V (%)	No.	V (%)	No.	V (%)
TiO <sub>2</sub> -TsPcCu <sup>a</sup>	627000	65,00	441000	66,67	496000	65,00
TiO <sub>2</sub> <sup>b</sup>	587000	50,46	410600	54,00	395500	50,46
TsPcCu <sup>c</sup>	553000	72,00	387500	75,00	400000	72,00
Medio(control)	650000	67,88	486500	68,34	518000	67,88

Monocapas de células crecidas en placas de 24 pozos (60,000 cils) a 37° C, fueron tratadas con los compuestos. <sup>a</sup>10 µg de TiO<sub>2</sub>-TsPcCu. <sup>b</sup>9,95 µg de TiO<sub>2</sub>. <sup>c</sup>0,05 µg de TsPcCu.

Las diferencias no fueron significativas (p>0.05, ANOVA) entre tratamientos o cada uno con el control.



**Figura 36.** Comparación del efecto tóxico de los compuestos sobre cultivos de células Hela. (a): sobre el crecimiento y (b): sobre la viabilidad celular. Promedio de tres experimentos (Tabla 3).

#### 4.2.4. Efecto fototóxico de los compuestos

**Tabla 4. Efecto fototóxico de los compuestos sobre el crecimiento (No.) y la viabilidad (V) de células Hela.**

9 horas antes de irradiación						
Compuestos	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
	No.	V (%)	No.	V (%)	No.	V (%)
TiO <sub>2</sub> -TsPcCu <sup>a</sup>	272500	93,12	187500	88,00	190000	88,30
TiO <sub>2</sub> <sup>b</sup>	272500	93,12	187500	88,00	190000	88,30
TsPcCu <sup>c</sup>	272500	93,12	187500	88,00	190000	88,30
Medio(control)	272500	93,12	187500	88,00	190000	88,30
12 horas de tratamiento						
Compuestos	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
	No.	V (%)	No.	V (%)	No.	V (%)
TiO <sub>2</sub> -TsPcCu <sup>a</sup>	434000	67,00	280000	66,25	273000	62,82
TiO <sub>2</sub> <sup>b</sup>	469000	62,69	333000	55,10	290500	46,99
TsPcCu <sup>c</sup>	392000	69,64	255500	68,00	294000	69,39
Medio(control)	472000	64,60	267000	62,40	332500	58,95
18 horas de tratamiento						
Compuestos	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
	No.	V (%)	No.	V (%)	No.	V (%)
TiO <sub>2</sub> -TsPcCu <sup>a</sup>	483000	59,65	283500	62,00	343000	60,00
TiO <sub>2</sub> <sup>b</sup>	469000	66,30	354000	63,50	296000	59,60
TsPcCu <sup>c</sup>	462000	68,00	371000	59,40	374500	61,70
Medio(control)	544000	71,40	380000	67,20	372000	68,00
24 horas de tratamiento						
Compuestos	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
	No.	V (%)	No.	V (%)	No.	V (%)
TiO <sub>2</sub> -TsPcCu <sup>a</sup>	605500	63,20	360500	67,40	382000	68,40
TiO <sub>2</sub> <sup>b</sup>	465500	59,40	332000	58,00	280000	58,82
TsPcCu <sup>c</sup>	440000	67,40	378000	64,00	276500	66,90
Medio(control)	672000	65,60	441000	72,22	489000	68,80

Monocapas de células crecidas en placas de 24 pozos (60,000 cels) a 37° C, fueron tratadas con los compuestos <sup>a</sup>10 µg de TiO<sub>2</sub>-TsPcCu, <sup>b</sup>9,95 µg de TiO<sub>2</sub> y <sup>c</sup>2 µg de TsPcCu. Y luego se expusieron a luz visible (Parte experimental).

Las diferencias no fueron significativas (p>0.05, ANOVA) entre tratamientos o cada uno con el control.

En la tabla 4, se muestran los datos de densidad y viabilidad celular a las 9 horas antes de la irradiación, y a las 12, 18 y 24 horas postirradiación de tres experimentos realizados para la determinación del efecto fototóxico de los compuestos.

En la figura 37 (a), se comparan los valores promedio de las pruebas realizadas con irradiación láser de los resultados de la tabla 4. Se pueden atribuir las siguientes conductas en cuanto al crecimiento celular: El  $\text{TiO}_2$  causa un decrecimiento de la densidad celular a partir de las 18 h con una diferencia de 59.000 células/mL con respecto al control negativo, donde su efecto más marcado es a las 24 horas ( $3,6 \times 10^5$  células/mL) comparado con el crecimiento normal ( $5,3 \times 10^5$  células/mL), aún cuando el uso del láser garantiza la exclusión de luz en el rango del ultravioleta, longitud de onda responsable de la activación del  $\text{TiO}_2$ . En el caso de la TsPcCu, presentó una inhibición de crecimiento a partir de las 12 h; donde la diferencia de densidad celular fue de  $7,0 \times 10^3$  células/mL con respecto al control negativo y este efecto se hace más notorio a las 24 h, donde la diferencia es de  $1,7 \times 10^5$  células/mL. Por su parte el sólido TsPcCu- $\text{TiO}_2$ , para el cual se esperaba un efecto sinérgico que incrementara la actividad fotodinámica de la TsPcCu, presentó un efecto de disminución del crecimiento celular a partir de las 12 h, y su mayor efecto se obtuvo a

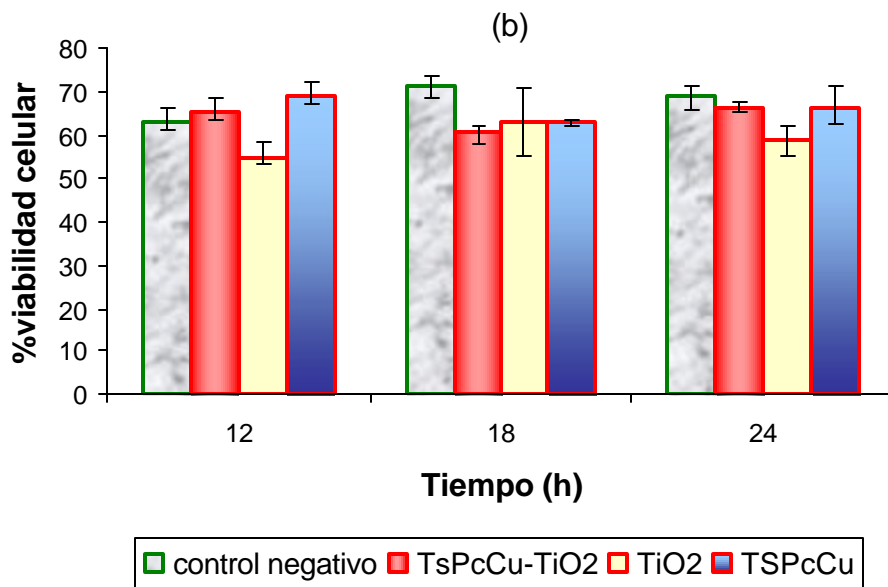
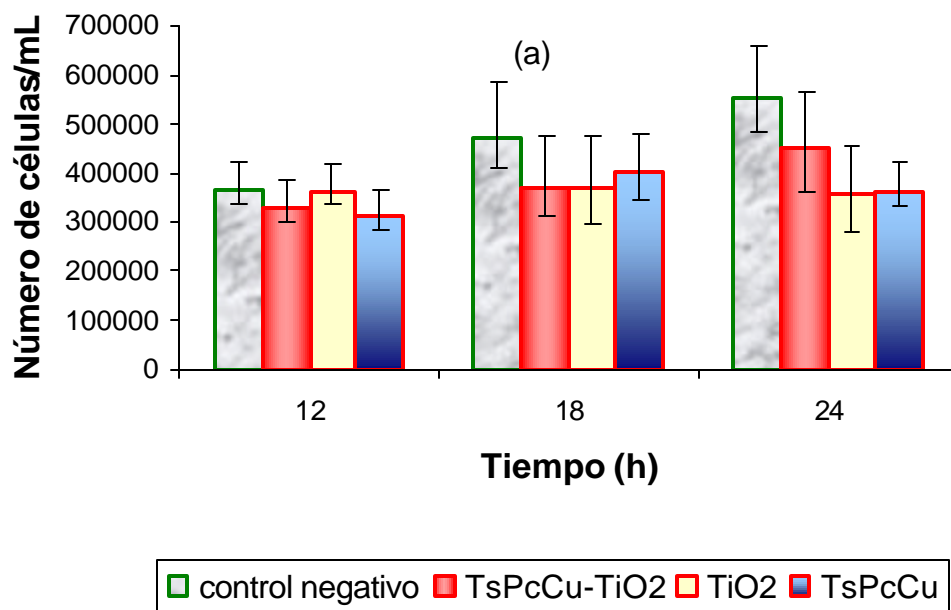
las 24 horas mostrando una densidad celular de  $4,5 \times 10^5$  células/mL, comparada con la del control negativo ( $5,3 \times 10^5$  células/mL). En general se produce un retraso en el aumento de la densidad celular en los tres compuestos a partir de las 12 horas postirradiación.

La figura 37 (b), muestra la viabilidad de los cultivos irradiados. El porcentaje de células vivas tratadas con TsPcCu a las 18 horas es mayor que en el control negativo; puede ser debido a la aceleración que se presentó en el proceso de replicación celular por la adición de dicho fármaco, pero a las 18 y 24 horas hay una leve disminución del porcentaje de viabilidad con respecto al control negativo, lo que permite estipular que aunque aumenta la rapidez de replicación al mismo tiempo produce mayor efecto letal a las 18 y 24 horas. El  $\text{TiO}_2$  presenta un comportamiento de viabilidad diferente al control negativo, su efecto de inhibición es mayor al compararlo con los compuestos TsPcCu y TsPcCu- $\text{TiO}_2$ . Un ejemplo de ello puede observarse a las 18 horas donde la densidad celular fue  $3,7 \times 10^5$  células/mL, en comparación con el cultivo en crecimiento normal donde la densidad es  $4,3 \times 10^5$  células/mL.

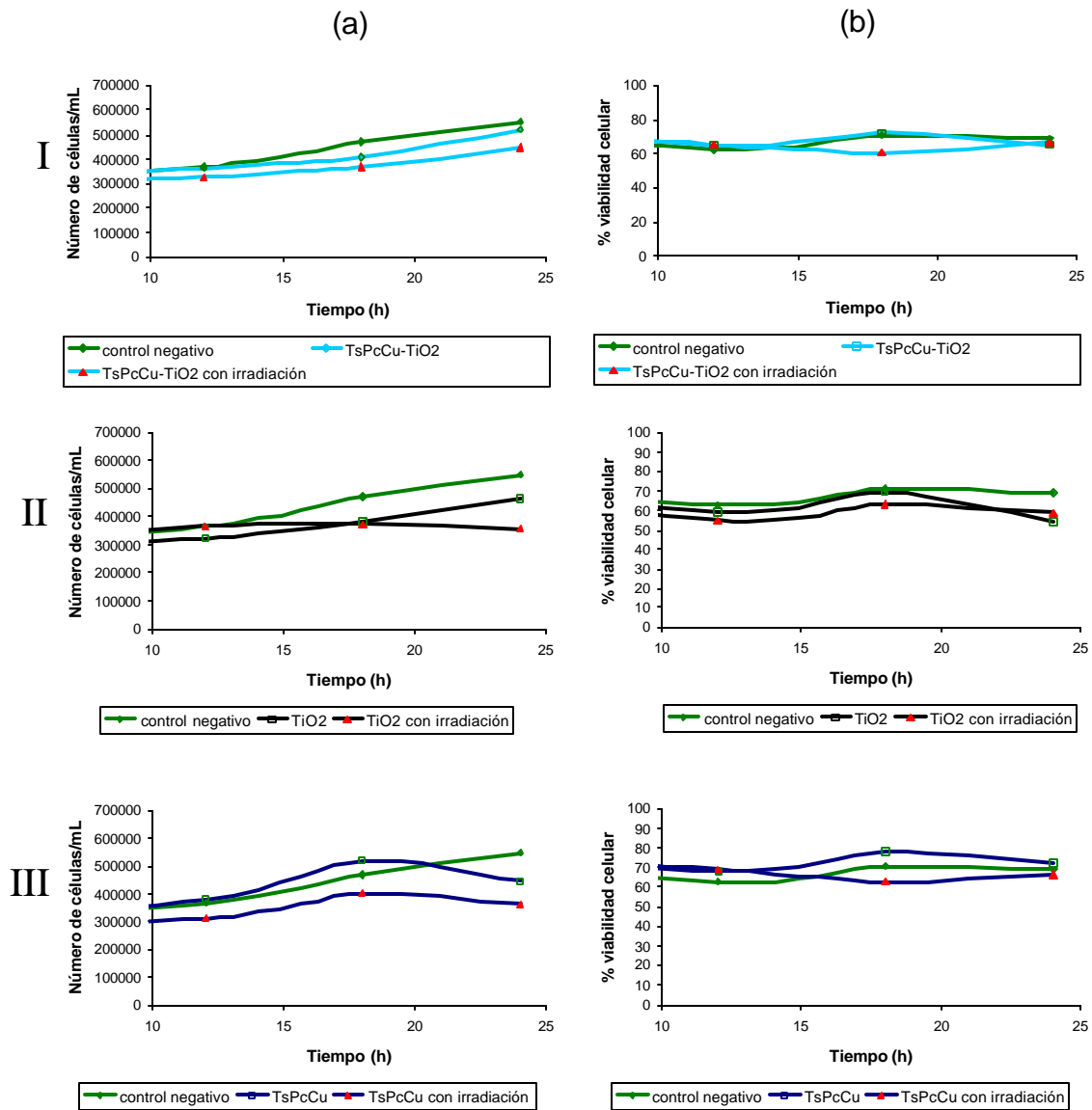
Los efectos producidos por el compuesto estudiado y los respectivos controles no mostraron diferencias significativas con  $p = 0,886$  y  $p =$

0.488 para densidad y porcentaje de viabilidad celular respectivamente.

Los resultados observados para los cultivos irradiados podrían interpretarse, que tanto la concentración del compuesto, así como la intensidad de radiación no fueron apropiadas para observar un efecto más oxidativo sobre las células.

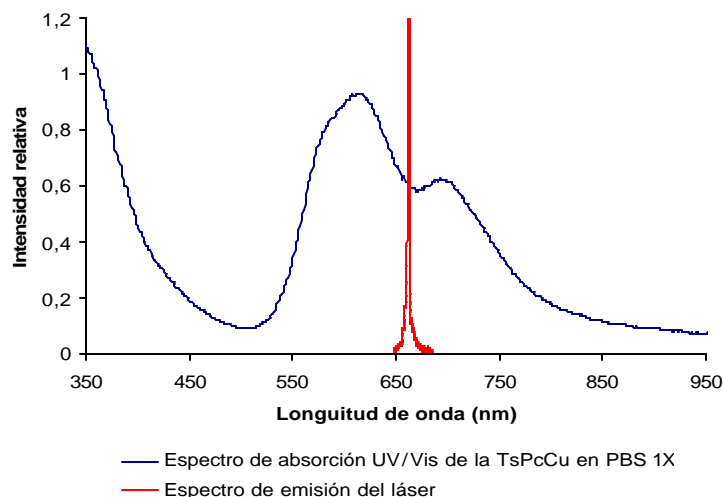


**Figura 37.** Comparación del efecto fototóxico de los compuestos (a) sobre el crecimiento celular y (b) sobre la viabilidad celular.



**Figura 38.** Efecto de la luz sobre la actividad de los compuestos; (a) sobre la densidad celular y (b) la viabilidad celular. I TsPcCu-TiO<sub>2</sub>; II TiO<sub>2</sub>; III TsPcCu.

En la figura 38, se confronta el efecto de la luz sobre la actividad de cada uno de los compuestos. Los resultados de viabilidad cuando se irradió, son semejantes a los de la placa que se mantuvo en la oscuridad para todos los fotosensibilizadores. Por otro lado, el efecto de inhibición de crecimiento celular se vio más marcado cuando se irradió, a pesar de usar una longitud de onda que no corresponde al máximo de absorción de la tetrasulfoftalocianina de cobre (figura 39). Se observó que el  $\text{TiO}_2$  presentó el mayor efecto fototóxico con respecto a los compuestos evaluados.



**Figura 39.** Superposición del espectro de absorción UV/Vis de la TsPcCu, con el espectro de emisión del láser.

En general se observa que tanto la densidad como la viabilidad celular, muestran cierta tendencia a disminuir con respecto al control negativo,

cuando los cultivos tratados con los compuestos son expuestos a irradiación. Probablemente no se observó un mayor efecto sobre los cultivos de células HeLa, debido a las condiciones de concentración e irradiación usadas. Ya que los resultados pueden estar afectados por el bajo contenido intracelular de los compuestos, debido a las concentraciones utilizadas. Por otra parte, quizás, el uso de una longitud de onda que no coincide con los máximos de absorción de la tetrasulfoftalocianina de cobre y de un tiempo insuficiente de irradiación para generar una concentración apropiada de especies oxidantes.

## 5. CONCLUSIONES

- Se encontró un bajo efecto fototóxico para una concentración de 0.05  $\mu\text{g/mL}$  de TSPcCu sobre la viabilidad y concentración de células HeLa crecidas *in-vitro* al ser irradiadas a una  $\lambda \sim 665\text{nm}$ .
- No se apreció un efecto potenciador del  $\text{TiO}_2$  sobre la actividad fototóxica de la TsPcCu a una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  de TsPcCu- $\text{TiO}_2$  (0,5% p/p) bajo las condiciones de tiempo e intensidad de irradiación empleados. Sin embargo el  $\text{TiO}_2$  preparado mostró el mejor efecto fotooxidativo.
- Se evaluó la actividad fototóxica de la tetrasulfoftalocianina de cobre anclada en oxido de titanio sintetizado por el método de sol-gel (TsPcCu- $\text{TiO}_2$ ) a una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  sobre el crecimiento *in vitro* de células humanas de cáncer de cérvix (células HeLa) a una  $\lambda$  de 665 nm, su efecto oxidativo fue muy leve en las condiciones de concentración y longitud de onda no apropiada para la máxima absorción de la tetrasulfoftalocianina de cobre.

## 6. RECOMENDACIONES

- Evaluar la actividad fotodinámica de la TsPcCu-TiO<sub>2</sub> utilizando una fuente de luz que abarque de manera puntual los máximos de absorción de este fotosensibilizador o usar una fuente lumínica continua, que proporcione la longitud de onda adecuada.
- Realizar ensayos con otras concentraciones de fármacos, proporciones de anclaje y modificar la intensidad de radiación incidente sobre los cultivos.
- Evaluar el ingreso y localización del fotosensibilizador y sus respectivos controles en la célula con ayuda de la Microscopía de Fluorescencia.
- Matener los cultivos celulares a una temperatura óptima para su crecimiento normal (~37° C) mientras son irradiados.
- Evaluar otros métodos *sol-gel* de síntesis del TiO<sub>2</sub> y verificar el tamaño de partícula nanoestructurado del sólido.

- Verificar si la intensidad del haz sobre cada pozo es semejante, mediante la técnica de actinometría química.
- Comparar resultados haciendo uso de otros métodos de conteo celular.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- ABRAMCZYK, H.; SZYMCZYK, I.; WALISZEWSKA, G.; and LEBIODA, A. Photoinduced redox processes in phthalocyanine derivatives by resonance Raman spectroscopy: *J. Phys. Chem. A.* 108(2), 2004; pp. 264-274.
- ALLEN, Cynthia M.; LANGLOIS, Réjean; SHARMAN, Wesley M.; LA MADELEINE, Carole and VAN LIER, Johan E. Photodynamic properties of amphiphilic derivatives of aluminum tetrasulfophthalocyanine: *Photochemistry and Photobiology.* 76(2), 2002; pp. 208–216.
- ANDERSON, Cathy Y.; FREYE, Kristin; TUBESING, Karen A; LI, Ying-Syi; KENNEY, Malcolm E.; MUKHTAR, Hasan and ELMETS, Craig A. A comparative analysis of silicon phthalocyanine photosensitizers for *in vivo* photodynamic therapy of RIF-1 tumors in C3H mice: *J. Photochemistry and Photobiology.* 67(3), 1998; pp. 332–336.

- AUGUGLIARO, V.; BLANCO GÁLVEZ, J.; CÁCERES VÁZQUEZ, J.; GARCÍA LÓPEZ, E.; LODDO, V.; LÓPEZ MUÑOZ, M.J.; MALATO RODRÍGUEZ, S.; MARCI, G.; PALMISANO, L.; SCHIAVELLO, M. and SORIA RUIZ, J. Photocatalytic oxidation of cyanide in aqueous TiO<sub>2</sub> suspensions irradiated by sunlight in mild and strong oxidant conditions: *Catalysis Today*. 54, 1999; pp. 245–253.
- BACH, U., GRATZEL, M. et al. *Nature*: 395, 1998; pp. 583–585.
- BERG, K.; PRYDZ, K. and MOAN, J. Photochemical treatment with lysosomally localized dye tetra(4-sulfonatophenyl)porphine results in lysosomal release of the dye but not of  $\alpha$ -N-acetyl-Dglucosamidase activity: *Biochim. Biophys. Acta* 1993, 1158, pp. 300-306.
- Biblioteca de Consulta Microsoft © 1993-2003 Microsoft Corporation. Reservados todos los derechos.
- BLAKE, Pin-Ching Maness; HUANG, Zheng; WOLFRUM, Edward J. and HUANG, Jie. Application of the photocatalytic chemistry of titanium dioxide to disinfection and the killing of cancer cells: *Separation and Purification Methods*: 28(1), 1999; pp. 1-50.

- BOURRE, L.; SIMONNEAUX, G.; FERRAND, Y.; THIBAUT, S.; LAJAT, Y. and PATRICE, T. Synthesis, and *in vitro* and *in vivo* evaluation of a diphenylchlorin sensitizer for photodynamic therapy: *J. Photochem. Photobiol., B.* 69, 2003; pp. 179-192.
- BROWN, J.; BROWN, S. and VERNON, D. Photodynamic therapy- new light on cancer treatment. *JDSC.* 115, 1999; pp. 249-253.
- BRUCE, Susan. Photodynamic therapy: Another option in cancer treatment: *Clin. J. of Oncology Nursing.* 5(3), 2001.
- BYRNE, J. Long-term genetic and reproductive effects of ionizing radiation and chemotherapeutic agents on cancer patients and their offspring: *Chem. Abst.* 131, 1999.
- CARTER, Jeanne; ROWLAND, Katherine; CHI, Dennis; BROWN, Carol; ABU-RUSTUM, Nadeem; CASTIEL, Mercedes and BARAKAT, Richard. Gynecologic cancer treatment and the impact of cancer-related infertility: *Gynecologic Oncology.* 97, 2005; pp. 90–95.

- CAUCHON, Nicole; TIAN, Hongjian; LANGLOIS, Réjean; MADELEINE, Carole; MARTIN, Stephane; ALI, Hasrat; HUNTING, Darel; and VAN LIER, Johan E. Structure-photodynamic activity relationships of substituted zinc trisulfophthalocyanines: *Bioconjugate Chem.* 16(1), 2005; pp. 80-89.
- CHAKRABORTI, A. S. Interaction of porphyrins with heme proteins a brief review: *Mol. Cell. Biochem.* 253, 2003; pp. 49-54.
- CHO, Sungmin and CHOI, Wonyong. Solid-phase photocatalytic degradation of PVC-TiO<sub>2</sub> polymer composites: *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 143(2-3), 2001; pp. 221-228.
- CHWIŁKOWSKA, Agnieszka; SACZKO, Jolanta; BIELEWICZ, Julita; PATALAS, Dorota; and BANACE, Teresa. The localization of the photosensitizing dyes photofrin II and hypericin in malignant cells: *Cell. Mol. Biol. Lett.* 7, 2002; pp. 88.
- CIFUENTES BORRERO, Rodrigo; LOMANTO MORAN, Antonio; *et all.* Texto de obstetricia y ginecología. Sociedad Colombiana de

obstetricia y ginecología. Primera edición. Distribuna. 2004, Bogotá- Colombia.

- CONNOLLY, Denise C.; GREENSPAN, David L.; WU, Rong; REN, Xiaodan; DUNN, Rodney L.; SHAH, Keerti V.; JONES, Ronald W.; BOSCH, F. Xavier; MUÑOZ, Nubia and CHO, Kathleen R. Loss of p16 expression in invasive cervical carcinomas and intraepithelial lesions associated with invasive disease: *Clinical Cancer Research*. 6, 2000; pp. 3505–3510.
- CRAMERS, P.; RUEVEKAMP, M.; OPPELAAR, H.; DALESIO, O.; BAAS, P. and STEWART, F. A. Foscan uptake and tissue distribution in relation to photodynamic therapy: *Br. J. Cancer*. 88, 2003; pp. 283-290.
- DENNIS, E. J.; DOLMANS, G. C.; FUKUMURA, D. and JAIN, R. K. TIMELINE: Photodynamic therapy for cancer: *Nat. Rev. Cancer*. 3, 2003; pp. 380-387.

- DETTY, Michael; GIBSON, Scott and WAGNER, Stephen. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy: *J. Medical Chemistry*. 47(16), 2004; pp. 3897-3911.
- DÍAZ-RUBIO, Eduardo. La oncología médica como especialidad. Capítulo 11. Oncología clínica básica. Arán, Madrid, 2000; pp. 21-23.
- DOUGHERTY, T. J. Hematoporphyrin as a photosensitizer of tumors: *Photochem. Photobiol.* 38, 1983; pp. 377-379.
- DOUGHERTY, TJ. Photosensitization of malignant tumors: *Semin. Surg. Oncol.* 2, 1986; pp. 24–37.
- DOUGHERTY, TJ.; GOMER, CJ.; HENDERSON, BW.; et al. Photodynamic therapy: *J Natl. Cancer Inst.* 90, 1998; pp. 889–905.
- DOUGHERTY, TJ.; POTTER, WR. and WEISHAUP, KR. The structure of the active component of hematoporphyrin derivative. In: Doiron DR, Gomer CJ, editors. Porphyrin localization and treatment of tumors. New York, NY: Alan R Liss; 1984.

- EINAGA, Hisahiro; FUTAMURA, Shigeru and IBUSUKI, Takashi. Heterogeneous photocatalytic oxidation of benzene, toluene, cyclohexene and cyclohexane in humidified air: comparison of decomposition behavior on photoirradiated TiO<sub>2</sub> catalyst: *Appl. Catal. B: Environ.*, 38(3), 2002; pp. 215-225.
- EL-SHARABASY, M. M.; EL-WASEEF, A. M.; HAFEZ, M. M. and SALIM, S. A. Porphyrin metabolism in some malignant diseases: *Br. J. Cancer.* 65, 1992; pp. 409-412.
- ESCUDERO VILLANUEVA, A.; GUILLÉN BARONA, C.; NAGORE ENGUÍDANOS, E.; SEVILA LLINARES, A.; SANMARTÍN JIMÉNEZ, O. y BOTELLA ESTRADA, R. Terapia fotodinámica en el tratamiento de la queratosis actínica: *Servicio de Dermatología. Instituto Valenciano de Oncología (IVO).* 4(3), 2001. pp. 190-194.
- EXADAKTYLOU, D.; KURWA, H. A.; CALONJE, E. and BARLOW, R. J. Treatment of Darier's disease with photodynamic therapy: *Br. J. Dermatol.* 149, 2003; pp. 606-610.

- FERRAND, Y.; BOURRE, L.; SIMONNEAUX, G.; THIBAUT, S.; ODOBEL, F.; LAJAT, Y. and PATRICE, T. Hydroporphyrins as tumor photosensitizers: Synthesis and photophysical studies of 2,3-dihydro-5,-15-di(3,5-dihydroxyphenyl) porphyrin: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 2003; pp. 833-835.
- FERRAUDI, G. Phthalocyanines: Photochemical properties of metallophthalocyanines in homogeneous solution. USA : Wiley, 1997. Chap. 4. pp. 552-763.
- FIGGE, FJ.; WIELAND, GS. and MANGANIELLO, LOJ. Cancer detection and therapy: affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins: *Proc Soc Exp Biol Med.* 1948; pp. 68:640.
- FOLEY, P. Clinical efficacy of methyl aminolevulinate (Metvix) photodynamic therapy: *J. Dermatol. Treat.* 14 (Suppl. 3), 2003; pp. 15-22.

- FRACKOWIAK, Danuta; ION, Rodica-Mariana; and WASZKOWIAK, Aneta. Spectral properties of phthalocyanines oriented in stretched polymer films: *J. Phys. Chem. B.* 106(51), 2002; pp. 13154-13160.
- FREEMAN, M.; VINCIULLO, C.; FRANCIS, D.; SPELMAN, L.; NGUYEN, R.; FERGIN, P.; THAI, K.-E.; MURRELL, D.; WEIGHTMAN, W.; ANDERSON, C.; REID, C.; WATSON, A. and FOLEY, P. A comparison of photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinate (Metvix) with single cycle cryotherapy in patients with actinic keratosis: a prospective, randomized study: *J. Dermatol. Treat.*14, 2003; pp. 99-106.
- GAULLIER, J. M.; BERG, K.; PENG, Q.; ANHOLT, H.; SELBO, P. K.; MA, L. W. and MOAN, J. Use of 5-aminolevulinic acid esters to improve photodynamic therapy on cells in culture: *Cancer Res.* 57, 1997; pp. 1481-1486.
- GORMAN, Aoife; KILLORAN, John; O'SHEA, Caroline; KENNA, Tony; GALLAGHER, William M. and O'SHEA, Donal F. In vitro demonstration of the heavy-atom effect for photodynamic therapy: *J. Am. Chem. Soc.* 126(34), 2004; pp. 10619-10631.

- HAQUE, S.A., GRATZEL, M., I TACHIBANA, et al: *J. Phys. Chem. B.* 104, 2000; pp. 538–547.
- HARIMA, Yoko; HARIMA, Keizo; SAWADA, Satoshi; TANAKA, Yoshimasa; ARITA, Seizaburo and OHNISHI, Takeo. Loss of heterozygosity on chromosome 6p21.2 as a potential marker for recurrence after radiotherapy of human cervical cancer: *Clinical Cancer Research.* 6, 2000; pp. 1079–1085.
- HASAN, Tayyaba; MOOR, Anne C.E. and ORTEL, Bernard. Principles of Radiation Oncology. Chapter 36: Photodynamic therapy of cancer. 2000; pp. 489-502.
- HENCH, Larry L. and WEST, Jon K. The sol-gel process: *Chem. Rev.* 90, 1990; pp. 33-72.
- HILMEY, D. G.; ABE, M.; NELEN, M. I.; STILTS, C. E.; BAKER, G. A.; BAKER, S. N.; BRIGHT, F. V.; DAVIES, S. R.; GOLLNICK, S. O.; OSEROFF, A. R.; GIBSON, S. L.; HILF, R. and DETTY, M. R. Water-soluble, coremodified porphyrins as novel longer-wavelength-absorbing sensitizers for photodynamic therapy. 2. Effects of core

heteroatoms and *meso*-substituents on biological activity: *J. Med. Chem.* 45, 2002; pp. 449-461.

- HONE, Duncan C.; WALKER, Peter I.; EVANS-GOWING, Richard; FITZGERALD, Simon; BEEBY, Andrew; CHAMBRIER, Isabelle; COOK, Michael J. and RUSSELL, David A. Generation of cytotoxic singlet oxygen via phthalocyanine-stabilized gold nanoparticles: A potential delivery vehicle for photodynamic therapy: *Langmuir*. 18(8), 2002; pp. 2985-2987.
- HUANG, Z.; CHEN, Q.; BRUN, P.-H.; WILSON, B. C.; SCHERZ, A.; SALOMON, Y.; LUCK, D. L.; BECKERS, J. and HETZEL, F. W. Studies of a novel photosensitizer Pd-bacteriopheophorbide (Tookad) for the prostate cancer PDT in canine model: *Proc. SPIESInt. Soc. Opt. Eng.* 5254 (Photonics and Imaging in Biology and Medicine), 2003; pp. 83-90.
- IINUMA, Seiichi; SCHOMACKER, Kevin T.; WAGNIERES, Georges; RAJADHYAKSHA, Milind; BAMBERG, Michael; MOMMA, Tetsuo and HASAN, Tayyaba. *In vivo* fluence rate and fractionation effects

on tumor response and photobleaching: *J. Cancer Research.* 59, 1999; pp. 6164-6170.

- JARAMILLO, R. Eliminación de Mercaptos Presentes en Gasolina Mediante Reacción de Autooxidación en Planta-piloto utilizando Ftalocianina de Cobalto Encapsulada en una Zeolita como Catalizador Heterogéneo en Lecho Fijo. Tesis de grado, Programa de pregrado, Departamento de Química, Facultad de Ciencias. UIS. Colombia, 1990.
- KEIZER, S.; HAN, W. and SRILLMAN, M. Photochemically-induced radical reactions of zinc phthalocyanine: *J. Inorg. Chem.* 41, 2002; pp. 353-358.
- KENNEDY, J. C.; MARCUS, S. L. and POTTIER, R. H. Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ALA): mechanisms and clinical results: *J. Clin. Laser Mod. Surg.* 14, 1996; pp. 289-304.

- KENNEDY, J. C.; POTTIER, R. H. and PROSS, D. C. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience: *J. Photochem. Photobiol. B* 6, 1990; pp. 143-148.
- KESSEL D. and CHOU TH. Tumor-localizing components of the porphyrin preparation hematoporphyrin derivative: *Cancer Res.* 43, 1983; pp. 1994–1999.
- KESSEL, D.; THOMPSON, P.; SAATIO, K. and NANTWI, K. D. Tumor localization and photosensitization by sulfonated derivatives of tetraphenylporphine: *Photochem. Photobiol.* 45, 1987; pp. 787-790.
- KOSTENICH, G. A.; ZHURAVKIN, I. N. and ZHAVRID, E. A. Experimental grounds for using chlorin e6 in the photodynamic therapy of malignant tumors: *J. Photochem. Photobiol., B.* 22, 1994; pp. 211-217.
- KOVAL, V. V.; CHERNONOSOV, A. A.; ABRAMOVA, T. V.; IVANOVA, T. M.; FEDOROVA, O. S.; DERKACHEVA, V. M. and LUKYANETS, E. A. Photosensitized and catalytic oxidation of DNA

by metallophthalocyanine-oligonucleotide conjugates: *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. 20(4–7), 2001; pp. 1259–1262.

- KRÝSOVÁ, Hana; JIRKOVSKÝ, Jaromír; KRÝSA, Josef; MAILHOT, Gilles and BOLTE, Michèle. Comparative kinetic study of atrazine photodegradation in aqueous  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$  solutions and  $\text{TiO}_2$  suspensions: *Applied Catalysis B: Environmental*. 40, 2003; pp. 1–12.
- LAMURAGLIA, GM.; KLYACHKIN, ML.; ADILI, F. and ABBOTT, WM. Photodynamic therapy of vein grafts: suppression of intimal hyperplasia of the vein graft but not the anastomosis: *J Vasc Surg*. 21(6), 1995; pp. 82-90.
- LATOS-GRAZYNSKI, L.; PACHOLSKA, E.; CHMIELEWSKI, P. J.; OLMSTEAD, M. and BALCH, A. L. Synthesis of 5,20-diphenyl-10,15-bis-(*p*-tolyl)-21-selenaporphyrin (SeDPDTPH): *Inorg. Chem*. 35, 1996; pp. 566-573.
- LAVILLE, I.; FIGUEIREDO, T.; LOOCK, B.; PIGAGLIO, S.; MAILLARD, P.; GRIERSON, D. S.; CARREZ, D.; CROISY, A. and

BLAIS, J. Synthesis, cellular internalization and photodynamic activity of glucoconjugated derivatives of tri and tetra(meta-hydroxyphenyl)chlorins: *Bioorg. Med. Chem.* 11, 2003; pp. 1643-1652.

- LENZMANN, F., KRUEGER, J., et al. *J. Phys. Chem. B.* 105, 2001; pp. 6347–6352.
- LEZNOFF, C. & LEVER, A. B. P. Phthalocyanines: Properties and applications. Eds.; VCH: New York, Vol. 1, 1993, Vol 2, 1993, Vol. 3, 1993, Vol. 4, 1996.
- LI, G.; GRAHAM, A.; CHEN, Y.; DOBHAL, M. P.; MORGAN, J.; ZHENG, G.; KOZYREV, A.; OSEROFF, A.; DOUGHERTY, T. J. and PANDEY, R. K. Synthesis, comparative photosensitizing efficacy, human serum albumin (site II) binding ability, and intracellular localization characteristics of novel benzobacteriochlorins derived from vicdihydroxybacteriochlorins: *J. Med. Chem.* 46, 2003; pp. 5349-5359.

- LIPSON RL. and BLADES EJ. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative: *Arch Dermatol.* 82, 1960; pp. 508–516.
- LIU, Mark O.; TAI, Chia-hung; SAIN, Meng-zhi; HU, Andrew Teh and CHOU, Fong-in. Photodynamic applications of phthalocyanines: *J. Photochem. and Photobiol.* 165, 2004; pp. 131-136.
- LÓPEZ, T.; HERNANDEZ-VENTURA, J.; GÓMEZ, R.; TZOMPANTZI, F.; SÁNCHEZ, E.; BOKHIMI, X. and GARCÍA, A. Photodecomposition of 2,4-dinitroaniline on Li/TiO<sub>2</sub> and Rb/TiO<sub>2</sub> nanocrystallite sol–gel derived catalysts: *J. of Molecular Catalysis A: Chemical.* 167, 2001; pp. 101–107.
- MANRIQUE MORENO, Marcela y TIBADUIZA RODRÍGUEZ, Belsy. Efecto fototóxico de las tetrasulfoftalocianinas metálicas ancladas al TiO<sub>2</sub> sobre cultivos celulares LLCMK<sub>2</sub>. Tesis de grado, Programa de pregrado, Departamento de Química, Facultad de Ciencias. Universidad Industrial de Santander. Colombia, 2002.
- MANYAK, MJ.; RUSSO, A. and GLATSTEIN, E. Photodynamic therapy: *J. Clinical Oncology.* 6, 1988; pp. 380-391.

- MARCINKOWSKA, E.; ZIOLKOWSKI, P.; PACHOLSKA, E.; LATOS-GRAZYNSKI, L.; CHMIELEWSKI, P. and RADZIKOWSKI, C. Z. The new sensitizing agents for photodynamic therapy: 21-selenaporphyrin and 21-thiaporphyrin: *Anticancer Res.* 17, 1997; pp. 3313-3320.
- MELE, Giuseppe; CICCARELLA, Giuseppe; VASAPOLLO, Giuseppe; GARCÍA-LÓPEZ, Elisa; PALMISANO, Leonardo and SCHIAVELLO, Mario. Photocatalytic degradation of 4-nitrophenol in aqueous suspension by using polycrystalline TiO<sub>2</sub> samples impregnated with Cu(II)-phthalocyanine: *Applied Catalysis B: Environmental.* 38, 2002; pp. 309–319.
- MENG, G. G.; JAMES, B. R.; SKOV, K. A. and KORBELIK, M. Porphyrin chemistry pertaining to the design of anti-cancer drugs; part 2, the synthesis and *in vitro* tests of water-soluble porphyrins containing in the *meso* positions, the functional groups: 4-methylpyridinium, 4-sulfonatophenyl, in combination with phenyl, 4-pyridyl, 4-nitrophenyl, or 4-aminophenyl: *Can. J. Chem.* 71, 1994, 2447-2457.

- MEYER-BETZ, F. Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des hämatoporphyrins und anderer Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffs: *Dtsch Arch Klin Med.* 112, 1913; pp. 476–503.
- MIAO, P.; ROBINSON, A. W. and PALMER, R. E. Nano-machining of silicon phthalocyanine dichloride films on H-passivated Si(111): *J. Phys. D: Appl. Phys.* 31, 1998; pp. L37–L40.
- MILLER, Jennifer. Photodynamic therapy: The sensitization of cancer cells to light: *J. of Chem. Ed.* 76(5), 1999; pp. 592-594.
- MORTON, C. A. Methyl aminolevulinate (Metvix) photodynamic therapy-practical pearls: *J. Dermatol. Treat.* 14 (Suppl. 3), 2003; pp. 23-26.
- Nazeeruddin, M., Kay, A., Rodicio, I., Humphrey-Baker, R., Müller, E., Liska, P., Vlachopoulos, N., Grätzel, M. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 2001; pp. 1613–1624.

- NIÑO, M., GIRALDO, S., et al. Catalizadores biomiméticos  $\alpha$ -fosfato de zirconio-ftalocianinas para la oxidación selectiva del ciclo hexano. Actas del XVII Simposio Iberoamericano de Catálisis. Portugal. 2000.
- O'REGAN, Brian; MOSER, Jacques; ANDERSON, Marc and GRATZEL, Michael. Vectorial electron injection into transparent semiconductor membranes and electric field effects on the dynamics of light-induced charge separation: *J. Phys. Chem.* 94, 1990; pp. 8720-8726.
- OEKERMANN, Torsten; YOSHIDA, Tsukasa; SCHLETTWEIN, Derck; SUGIURA, Takashi; and MINOURA, Hideki. Photoelectrochemical properties of ZnO/tetrasulfophthalocyanine hybrid thin films prepared by electrochemical self-assembly: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 3, 2001; pp. 3387-3392.
- OGUNSIPE, Abimbola; CHEN, Ji-Yao and NYOKONG, Tebello. Photophysical and photochemical studies of zinc(II) phthalocyanine derivatives—effects of substituents and solvents: *New J. Chem.* 7, 2004; pp. 822 – 827.

- PENG, Q.; BERG, K.; MOAN, J.; KONGSHAUG, M. and NESLAND, J. M. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. *J. Photochem. Photobiol.* 65, 1997; pp. 235-251.
- PHILLIPS D. Progress in Reaction Kinetics, Science and Technology Letters. USA: Vol. 22 No 34, 1997. p. 176-184.
- POTTER, W. R.; HENDERSON, B. W.; BELLNIER, D. A.; PANDEY, R. K.; VAUGHAN, L. A.; WEISHAUPT, K. R. and DOUGHERTY, T. J. Parabolic quantitative structure-activity relationships and photodynamic therapy: application of a three-component model with clearance to the *in vivo* quantitative structure-activity relationships of a congeneric series of pyropheophorbide derivatives used as photosensitizers for photodynamic therapy: *Photochem. Photobiol.* 70, 1999; pp. 781-788.
- PUSHPAN, S. K.; SRINIVASAN, A.; ANAND, V. R. G.; CHANDRASHEKAR, T. K.; SUBRAMANIAN, A.; ROY, R.; SUGIURA, K. and SAKATA, Y. Inverted *meso*-aryl porphyrins with

heteroatoms: characterization of thia, seleno, and oxo N-confused porphyrins: *J. Org. Chem.* 66, 2001, 153-161.

- RA., Hill; T., Esterowitz; J., Ryan; LH., Liaw; JS., Nelson; H., Yashiro; T., Krasieva; and MW., Berns. Photodynamic laser cyclodestruction with chloroaluminum sulfonated phthalocyanine (CASPC) or Photofrin (PII) vs. Nd:YAG laser cyclodestruction in a pigmented rabbit model: *Lasers Surg Med.* 17(2), 1995; pp. 166-71.
- RACHEL, Anita; SARAKHA, Mohamed; SUBRAHMANYAM, Machiraju and BOULE, Pierre. Comparison of several titanium dioxides for the photocatalytic degradation of benzenesulfonic acids: *Applied Catalysis B: Environmental* 37, 2002; pp. 293–300.
- RANJIT, K.; WILLNER, I. and BOSSMANN, S. *J. Phys. Chem. B.* 102, 1998; pp. 9397.
- REDDAN, Julie C.; YOUNG ANDERSON, Cathy; XU, Hui; HRABOVSKY, Sharon; FREYE, Kristin; FAIRCHILD, Roberta; TUBESING, Karen A. and ELMETS, Craig A. Immunosuppressive

effects of silicone phthalocyanine photodynamic therapy: *J. Photochem. Photobiol.* 70(1), 1999; pp. 72-77.

- SAN ROMÁN, E.: *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 1996. p. 102-109.
- SESSLER, J. L. and MILLER, R. A. Texaphyrins-new drugs with diverse clinical applications in radiation and photodynamic therapy: *Biochem. Pharmacol.* 59, 2000; pp. 733-739.
- SESSLER, J. L.; HEMMI, G.; MODY, T. D.; MURAI, T.; BURRELL, A. and YOUNG, S. W. Texaphyrins: synthesis and applications: *Acc. Chem. Res.* 27, 1994; pp. 43-50.
- SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M. and VAN LIER, J. E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications: *Drug Discovery Today.* 4, 1999; pp. 507-517.
- SHIMIZU, Ken-Ichi; KANEKO, Toshio; FUJISHIMA, Tomokazu; KODAMA, Tatsuya; YOSHIDA, Hisao and KITAYAMA, Yoshie. Selective oxidation of liquid hydrocarbons over photoirradiated TiO<sub>2</sub>

pillared clays: *Applied Catalysis A: General*. 225, 2002; pp. 185–191.

- STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D. and BRUCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy: *Tetrahedron*. 54, 1998; pp. 4151-4202.
- STILTS, C. E.; NELEN, M. I.; HILMEY, D. G.; DAVIES, S. R.; GOLLNICK, S. O.; OSEROFF, A. R.; GIBSON, S. L.; HILF, R. and DETTY, M. R. Watersoluble, core-modified porphyrins as novel, longer-wavelength-absorbing sensitizers for photodynamic therapy: *J. Med. Chem.* 43, 2000, 2403-2410.
- TANAKA, K. and REDDY, K.S.N. Photodegradation of phenoxyacetic acid and carbamate pesticides on TiO<sub>2</sub>: *Applied Catalysis B: Environmental*. 39, 2002; pp. 305–310.
- ULMAN, A.; MANASSEN, J.; FROLOW, F. and RABINOVICH, D. Synthesis of new tetraphenylporphyrin molecules containing heteroatoms other than nitrogen: II. Tetraphenyl-21-selena-23-thiaporphyrin and tetraphenyl-21, 23-diselenaporphyrin: *Tetrahedron Lett.* 1978; pp. 167-170.

- UZDENSKY, A.B.; ZHAVORONKOVA, A.A.; YU, O.; DERGACHEVA, V.M. & DERKACHEVA. Photodynamic effect of different aluminum and zinc phthalocyanines on isolated nerve cell.
- VOGL, Thomas J.; EICHLER, Katrin; MACK, Martin G.; ZANGOS, Stephan; HERZOG, Christopher; THALHAMMER, Axel and ENGELMANN, Kerstin. Interstitial photodynamic laser therapy in interventional oncology: *European Radiology*. 2004; pp. 1-20.
- Von TAPPEINER, HA. and JENSIONEK A. Therapeutische versuche mit fluorescierenden stoffen: *Munch Med Wochenschr.* 47, 1903; pp. 2042–2044.
- Von TAPPEINER, HA. and JODLBAUER, A. Die sensibilisierende wirkung fluorescierender substanzen: *gesammelte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung*. Leipzig, Germany: Vogel; 1907.
- WENG, Yu-Xiang; WANG, Yong-Qiang; ASBURY, John B.; GHOSH, Hireen N. and LIAN, Tianquan. Back electron transfer from TiO<sub>2</sub>

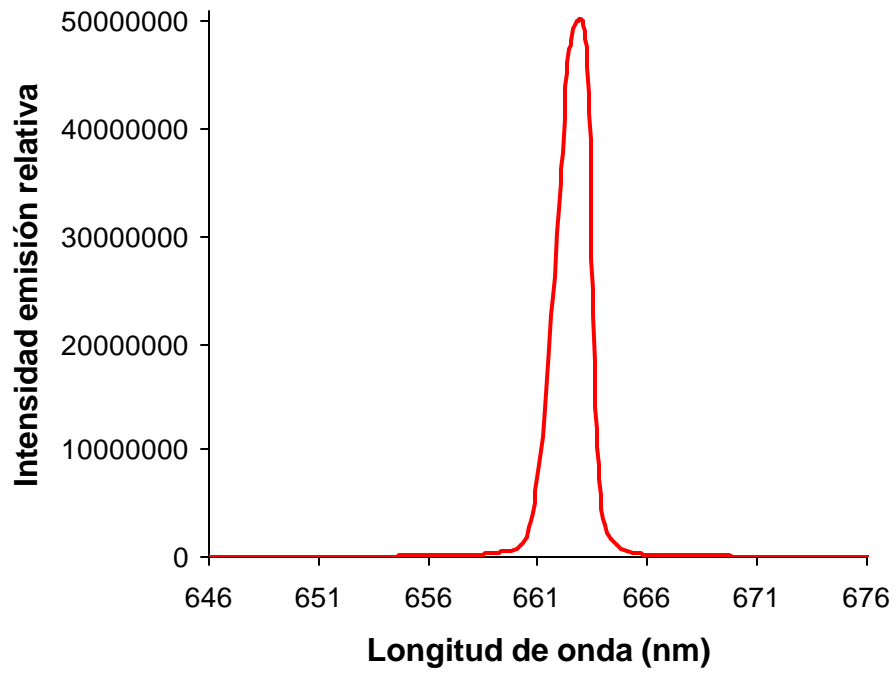
nanoparticles to  $\text{FeIII}(\text{CN})_6^{3-}$ : Origin of non-single-exponential and particle size independent dynamics: *J. Phys. Chem. B.* 104, 2000; pp. 93-104.

- WINKELMAN, J. W. and COLLINS, G. H. Neurotoxicity of tetraphenylporphinesulfonate TPPS<sub>4</sub> and its relation to photodynamic therapy: *J. Photochem. Photobiol.* 46, 1987; pp. 801-807.
- WONG, T.-W.; AIZAWA, K.; SHEYHEDIN, I.; WUSHUR, C. and KATO, H. Pilot study of topical delivery of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6): Implication of topical NPe6-photodynamic therapy: *J. Pharmacol. Sci.* 93, 2003; pp. 136-142.
- WYSS, P.; SCHWARZ, V.; DOBLER-GIRDZIUNAITE, D.; HORNING, R.; WALT, H.; DEGEN, A. and FEHR, M. K. Photodynamic therapy of locoregional breast cancer recurrences using a chlorin-type photosensitizer: *Int. J. Cancer.* 93, 2001; pp. 720-724.
- YOU, Youngjae; GIBSON, Scott L.; HILF, Russell; DAVIES, Sherry R.; OSEROFF, Allan R.; ROY, Indrajit; OHULCHANSKY, Tymish

- Y.; BERGEY, Earl J.; and DETTY, Michael R. Water soluble, core-modified porphyrins. 3. Synthesis, photophysical properties, and *in vitro* studies of photosensitization, uptake, and localization with carboxylic acid-substituted derivatives: *J. Med. Chem.* 46, 2003; pp. 3734-3747.
- YU, Jimmy C.; XIE , Yinde; TANG, Hung; ZHANG, Lizhi; CHAN, H.C.; and ZHAO, Jincai. Visible light-assisted bactericidal effect of metalphthalocyanine-sensitized titanium dioxide films: *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry.* 156, 2003; pp. 235–241.
  - YU, Jimmy C.; YU, Jiaguo; HO, Winghei ang ZHANG, Lizhi. Preparation of highly photocatalytic active nano-sized TiO<sub>2</sub> particles via ultrasonic irradiation: *Chem. Commun.* 2001; pp. 1942-1943.
  - YU, Tingxi; FERBER, Matthew J.; CHEUNG, Tak Hong; HUNG CHUNG, Tong Kwok; WONG, Yick Fu and SMITH,David I. The role of viral integration in the development of cervical cancer: *Cancer Genetics and Cytogenetics.* 158, 2005; pp. 27–34.

- ZAVOIANU, Rodica; DIAS, Cristina R. and PORTELA, Farinha. Stabilisation of  $\beta$ -NiNoO<sub>4</sub> in TiO<sub>2</sub>-supported catalysts: *Catalysis communications*. 2, 2001; pp. 37-42.
- ZHAN, Hongbing; CHEN, Wengzhe and and LIN, Chunying. Sol-gel-derived xerogel-doped nickel tetrasulfophthalocyanine and its optical properties: *Proceedings of SPIE*. 4918, 2002; pp. 10-14.
- ZHAO, Shuang; LI, Xiaofang; YANG, Min and SUN, Changqing. Fabrication and characterization of covalently attached multilayer films containing iron phthalocyanine and diazo-resins: *J. Mater. Chem.* 14 (5), 2004; pp. 840 – 844.

## ANEXO A



Espectro de emisión láser (MARCA B & W TEK, modelo BFW-670-300).