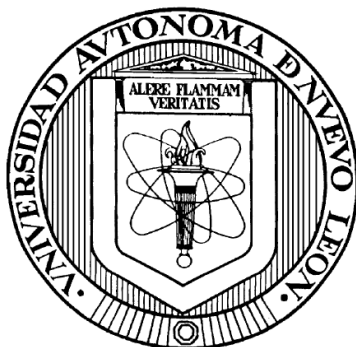


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



SÍNTESIS DE NUEVAS PORFIRINAS A₃B CON *p*-CLOROFENILO COMO UNO DE LOS SUSTITUYENTES *meso* Y DETERMINACIÓN DE SU POTENCIAL ACTIVIDAD FOTOSENSIBILIZADORA *in vitro*.

Por

Q.F.B. ERIKA LILIÁN LOREDO CALDERÓN

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en Farmacia.

Diciembre 2011

**SÍNTESIS DE NUEVAS PORFIRINAS A₃B CON *p*-CLOROFENILO COMO UNO DE
LOS SUSTITUYENTES *meso* Y DETERMINACIÓN DE SU POTENCIAL
ACTIVIDAD FOTOSENSIBILIZADORA *in vitro*.**

Aprobación de la Tesis:

Dra. Susana Thelma López Cortina
Asesor de Tesis.

Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas.
Comité Tutorial.

Dra. Yolanda Araceli Gracia Vásquez.
Comité Tutorial.

Dr. Edgar Abraham García Zepeda.
Comité Tutorial.

Dra. Ma. Teresa Garza González.
Subdirectora de Estudios de Posgrado.

**SÍNTESIS DE NUEVAS PORFIRINAS A₃B CON *p*-CLOROFENILO COMO UNO DE
LOS SUSTITUYENTES *meso* Y DETERMINACIÓN DE SU POTENCIAL
ACTIVIDAD FOTOSENSIBILIZADORA *in vitro*.**

Aprobación de la Tesis:

**Dra. Susana Thelma López Cortina
Asesor de Tesis.**

**Dra. Ma. Teresa Garza González.
Subdirectora de Estudios de Posgrado.**

RESUMEN**Nombre:** Erika Lilián Loredo Calderón.**Fecha de Graduación:** Diciembre, 2011**Universidad Autónoma de Nuevo León.****Facultad de Ciencias Químicas.****Título del Estudio:** SÍNTESIS DE NUEVAS PORFIRINAS A₃B CON *p*-CLOROFENILO COMO UNO DE LOS SUSTITUYENTES *meso* Y DETERMINACIÓN DE SU POTENCIAL ACTIVIDAD FOTOSENSIBILIZADORA *in vitro*.**Número de páginas:** 221**Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en Farmacia.****Área de Estudio:** Síntesis de moléculas con actividad biológica.

Propósito y Método del Estudio: La terapia fotodinámica es un método anticancerígeno que requiere de un fotosensibilizador (FS), luz y O₂. Dentro de los FS de 2ª generación se encuentran los tetrapirrólicos como las porfirinas. Las porfirinas tipo A₃B representan un área de oportunidad para la obtención de compuestos con aplicación como FS. El objetivo principal del trabajo fue realizar la síntesis de nuevas tetraarilporfirinas no simétricas A₃B y la determinación de su potencial actividad fotosensibilizadora *in vitro*. Para ello se llevó a cabo la síntesis siguiendo el método descrito por Lindsey, utilizando: *p*-clorobenzaldehído, *p*-metoxibenzaldehído y benzaldehído. La purificación de los productos se llevó a cabo mediante cromatografía en columna con gel de sílice; la caracterización por espectrofotometría UV-Vis, Resonancia Magnética Nuclear de protón y Espectrometría de Masas de Baja y Alta Resolución. Para determinar su citotoxicidad y actividad anticancerígena, se evaluaron en líneas celulares VERO, HeLa y MCF7 utilizando el reactivo WST-1

Contribuciones y Conclusiones: Se lograron sintetizar, purificar y caracterizar las porfirinas no simétricas A₃B (NS1E, NS2E, NS3E, NS4E, NS5E y NS6E). En el espectro de UV-Vis se obtuvo el patrón característico: banda Soret ~420 nm y bandas Q (4) entre 480 y 700 nm. La EM mostró el peso molecular del ión molecular y la RMN ¹H permitió corroborar la presencia del compuesto de interés gracias a las señales correspondientes a los protones presentes. Se realizó la determinación de la citotoxicidad y actividad anticancerígena donde la NS6E resultó ser el compuesto con mayor actividad y similar al control THFP.

FIRMA DEL ASESOR: _____

AGRADECIMIENTOS

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
TABLA DE CONTENIDO	vi
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE ESQUEMAS	xviii
NOMENCLATURA	xix
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. CÁNCER.....	1
1.2. ESTADÍSTICA A NIVEL MUNDIAL.....	1
1.3. ESTADÍSTICA EN MÉXICO.....	2
1.4. FACTORES CAUSALES DEL CÁNCER.....	3
1.5. TRATAMIENTOS.....	4
1.6. TERAPIA FOTODINÁMICA.....	7
1.6.1. MECANISMO DE ACCIÓN.....	9
1.7. FOTODEGRADACIÓN.....	12
1.8. FOTOSENSIBILIZADORES.....	14
1.9. PORFIRINAS COMO FOTOSENSIBILIZADORES.....	18
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES.....	22
2.1 SÍNTESIS ORGÁNICA.....	22
2.2 SÍNTESIS ORGÁNICA Y PRUEBAS BIOLÓGICAS.....	27
2.3 FOTOSENSIBILIZADORES.....	32
CAPÍTULO 3.....	37
3.1. HIPÓTESIS.....	37

3.2.	OBJETIVO GENERAL	37
3.3.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3.4.	JUSTIFICACIÓN.....	38
CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL		39
INFORMACIÓN GENERAL		39
4.1	SÍNTESIS DE PORFIRINAS NO SIMÉTRICAS (MÉTODO DE LINDSEY).	43
4.2	PURIFICACIÓN DE PORFIRINAS NO SIMÉTRICAS.	45
4.3	CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS.....	45
4.4	ANÁLISIS DE LA FOTODEGRADACIÓN DE LAS PORFIRINAS.	46
4.5	PRUEBAS BIOLÓGICAS EN LÍNEAS CELULARES.	47
4.5.1	Propagación celular.	49
4.5.2	Determinación de la viabilidad celular por la técnica WST-1 para evaluar la actividad citotóxica de las porfirinas.	49
4.5.3	Determinación de la viabilidad celular por la técnica WST-1 para evaluar la actividad anticancerígena de las porfirinas.	53
4.5.4	Determinación de apoptosis por la técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling).....	56
CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		59
A. SÍNTESIS ORGÁNICA.....		59
5.1.	PORFIRINA NO SIMÉTRICA NS1E.	59
5.1.1.	SÍNTESIS DE NS1E.	59
5.1.2.	PURIFICACIÓN DE NS1E.....	61
5.1.3.	RENDIMIENTO DE NS1E.....	63
5.1.4.	CARACTERIZACIÓN DE NS1E.....	63
5.2.	PORFIRINA NO SIMÉTRICA NS2E.	70
5.2.1.	SÍNTESIS DE NS2E.	70
5.2.2.	PURIFICACIÓN DE NS2E.....	71
5.2.3.	RENDIMIENTO DE NS2E.....	74
5.2.4.	CARACTERIZACIÓN DE NS2E.....	74
5.3.	PORFIRINA NO SIMÉTRICA NS3E.	81

5.3.1.	SÍNTESIS DE NS3E.	81
5.3.2.	PURIFICACIÓN DE NS3E.	83
5.3.3.	RENDIMIENTO DE NS3E.	85
5.3.4.	CARACTERIZACIÓN DE NS3E.	85
5.3.4.3.	ESPECTRO MASAS.	87
5.3.4.4.	MASAS ALTA RESOLUCIÓN.	87
5.4.	PORFIRINA NO SIMÉTRICA NS4E.	87
5.4.1.	SÍNTESIS DE NS4E.	87
5.4.2.	PURIFICACIÓN DE NS4E.	88
5.4.3.	RENDIMIENTO DE NS4E.	90
5.4.4.	CARACTERIZACIÓN DE NS4E.	91
5.5.	PORFIRINA NO SIMÉTRICA NS5E.	97
5.5.1.	SÍNTESIS DE NS5E.	97
5.5.2.	PURIFICACIÓN DE NS5E.	98
5.5.3.	RENDIMIENTO DE NS5E.	100
5.5.4.	CARACTERIZACIÓN DE NS5E.	100
5.6.	PORFIRINA NO SIMÉTRICA NS6E.	107
5.6.1.	SÍNTESIS DE NS6E.	107
5.6.2.	PURIFICACIÓN DE NS6E.	108
5.6.3.	RENDIMIENTO DE NS6E.	111
5.6.4.	CARACTERIZACIÓN DE NS6E.	111
B.	FOTODEGRADACIÓN.	116
C.	PRUEBAS BIOLÓGICAS.	127
5.9.	ENSAYOS DE ACTIVIDAD CITOTÓXICA.	127
5.9.1.	CITOTOXICIDAD DE NS1E.	127
5.9.2.	CITOTOXICIDAD DE NS2E.	130
5.9.3.	CITOTOXICIDAD DE NS3E.	133
5.9.4.	CITOTOXICIDAD DE NS4E.	137
5.9.5.	CITOTOXICIDAD DE NS5E.	140
5.9.6.	CITOTOXICIDAD DE NS6E.	143

5.10.	ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA.	146
5.10.1.	ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NS1E.	146
5.10.2.	ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NS2E.	149
5.10.3.	ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NS3E.	153
5.10.4.	ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NS4E.	156
5.10.5.	ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NS5E.	159
5.10.6.	ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NS6E.	162
5.11.	CITOTOXICIDAD COMPARATIVA DE NS1E-NS6E y THFP EN CÉLULAS HeLa. .	165
5.12.	CITOTOXICIDAD COMPARATIVA DE NS1E-NS6E y THFP EN CÉLULAS MCF7.	166
5.13.	EFFECTO ANTICANCERÍGENO COMPARATIVO DE NS1E-NS6E y THFP EN CÉLULAS HeLa.	168
5.14.	EFFECTO ANTICANCERÍGENO COMPARATIVO DE NS1E-NS6E y THFP EN CÉLULAS MCF7.	169
5.15.	EVALUACIÓN DEL ÍNDICE APOPTÓTICO.	176
5.15.1.	APOPTOSIS PRODUCIDA POR NS4E Y NS6E EN CÉLULAS HeLa y MCF7.	176
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.		182
ANEXOS		185
1.	METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE LAS PORFIRINAS SIMÉTRICAS.	185
1.1.	Síntesis por el método de Adler.	185
1.2.	Purificación de las porfirinas simétricas.	186
2.	RESULTADOS DE LAS PORFIRINAS SIMÉTRICAS.	186
2.1.	PORFIRINA SIMÉTRICA A ₄ <i>p</i> -CLOROFENILO (S1E).	186
2.1.1.	SÍNTESIS DE S1E.	186
2.1.2.	PURIFICACIÓN DE S1E.	187
2.1.3.	RENDIMIENTO DE S1E.	188
2.1.4.	CARACTERIZACIÓN DE S1E POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE BAJA RESOLUCIÓN.	188
2.2.	PORFIRINA SIMÉTRICA A ₄ <i>p</i> -METOXIFENILO (S2E).	189
2.2.1.	SÍNTESIS DE S2E.	189
2.2.2.	PURIFICACIÓN DE S2E.	190

2.2.3.	RENDIMIENTO DE S2E.	190
2.2.4.	CARACTERIZACIÓN DE S2E POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE BAJA RESOLUCIÓN.....	190
2.3.	SÍNTESIS DE LA PORFIRINA SIMÉTRICA A ₄ FENILO (S3E).	191
2.3.1.	SÍNTESIS DE S3E.	191
2.3.2.	PURIFICACIÓN DE S3E.....	192
2.3.3.	RENDIMIENTO DE S3E.	192
2.3.4.	CARACTERIZACIÓN DE S3E POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE BAJA RESOLUCIÓN.....	192
3.	DATOS ANALÍTICOS DE LAS PORFIRINAS A ₃ B SINTETIZADAS.....	194
3.1.	NS1E.....	194
3.2.	NS2E.....	194
3.3.	NS3E.....	194
3.4.	NS4E.....	195
3.5.	NS5E.....	195
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	198

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Mortalidad atribuida al cáncer OMS.	2
Tabla 2. Agentes externos que pueden causar cáncer.	4
Tabla 3. Porfirinas sintetizadas por Lindsey.....	25
Tabla 4. Porfirinas sintetizadas por Fagadar y colaboradores (*A ₃ B).....	26
Tabla 5. Radicales de las porfirinas sintetizadas por Banfi y colaboradores en 2004. ...	28
Tabla 6. Radicales de las porfirinas sintetizadas por Banfi <i>et.al</i> en el 2006.	30
Tabla 7. Porfirinas no simétricas tipo A ₃ B sintetizadas por el método de Lindsey.....	44
Tabla 8. Concentraciones probadas de los compuestos sintetizados.	50
Tabla 9. Reactivos empleados para la síntesis de la porfirina NS1E.	59
Tabla 10. Reactivos empleados para la síntesis de la porfirina NS2E.....	70
Tabla 11. Reactivos empleados para la síntesis de la porfirina NS3E.	81
Tabla 12. Reactivos empleados para la síntesis de la porfirina NS4E.	87
Tabla 13. Reactivos empleados para la síntesis de la porfirina NS5E.....	97
Tabla 14. Reactivos empleados para la síntesis de la porfirina NS6E.	107
Tabla 15. Resultados de citotoxicidad de NS1E en células HeLa.	128
Tabla 16. Porcentaje de viabilidad de NS1E en células HeLa.....	128
Tabla 17. Resultados de citotoxicidad de NS1E en células MCF7.	129
Tabla 18. Porcentaje de viabilidad de NS1E en células MCF7.	130
Tabla 19. Resultados de citotoxicidad de NS2E en células HeLa.	131
Tabla 20. Porcentaje de viabilidad de NS2E en células HeLa.....	131
Tabla 21. Resultados de citotoxicidad de NS2E en células MCF7.....	132
Tabla 22. Porcentaje de viabilidad de NS2E en células MCF7.	133
Tabla 23. Resultados de citotoxicidad de NS3E en células HeLa.	134
Tabla 24. Porcentaje de viabilidad de NS3E en células HeLa.....	134
Tabla 25. Resultados de citotoxicidad de NS3E en células MCF7.....	135

Tabla 26. Porcentaje de viabilidad de NS3E en células MCF7.	136
Tabla 27. Resultados de citotoxicidad de NS4E en células HeLa.	137
Tabla 28. Porcentaje de viabilidad de NS4E en células HeLa.....	137
Tabla 29. Resultados de citotoxicidad de NS4E en células MCF7.....	138
Tabla 30. Porcentaje de viabilidad de NS4E en células MCF7.	139
Tabla 31. Resultados de citotoxicidad de NS5E en células HeLa.	140
Tabla 32. Porcentaje de viabilidad de NS5E en células HeLa.....	140
Tabla 33. Resultados de citotoxicidad de NS5E en células MCF7.....	141
Tabla 34. Porcentaje de viabilidad de NS5E en células MCF7.	142
Tabla 35. Resultados de citotoxicidad de NS6E en células HeLa.	143
Tabla 36. Porcentaje de viabilidad obtenido de NS6E en células HeLa.	143
Tabla 37. Resultados de citotoxicidad de NS6E en células MCF7.....	144
Tabla 38. Porcentaje de viabilidad de NS6E en células MCF7.	145
Tabla 39. Resultados de la actividad anticancerígena de NS1E en células HeLa.....	147
Tabla 40. Porcentaje de viabilidad de NS1E en células HeLa.....	147
Tabla 41. Resultados de la actividad anticancerígena de NS1E en células MCF7.....	148
Tabla 42. Porcentaje de viabilidad de NS1E en células MCF7.	149
Tabla 43. Resultados de la actividad anticancerígena de NS2E en células HeLa.....	150
Tabla 44. Porcentaje de viabilidad de NS2E en células HeLa.....	150
Tabla 45. Resultados de la actividad anticancerígena de NS2E en células MCF7.....	151
Tabla 46. Porcentaje de viabilidad de NS2E en células MCF7.	152
Tabla 47. Resultados de la actividad anticancerígena de NS3E en células HeLa.....	153
Tabla 48. Porcentaje de viabilidad de NS3E en células HeLa.....	153
Tabla 49. Resultados de la actividad anticancerígena de NS3E en células MCF7.....	154
Tabla 50. Porcentaje de viabilidad de NS3E en células MCF7.	155
Tabla 51. Resultados de la actividad anticancerígena de NS4E en células HeLa.....	156
Tabla 52. Porcentaje de viabilidad de NS4E en células HeLa.....	156
Tabla 53. Resultados de la actividad anticancerígena de NS4E en células MCF7.....	157
Tabla 54. Porcentaje de viabilidad de NS4E en células MCF7.	158

Tabla 55. Resultados de la actividad anticancerígena de NS5E en células HeLa.....	159
Tabla 56. Porcentaje de viabilidad de NS5E en células HeLa.....	159
Tabla 57. Resultados de la actividad anticancerígena de NS5E en células MCF7.....	160
Tabla 58. Porcentaje de viabilidad de NS5E en células MCF7.	161
Tabla 59. Resultados de la actividad anticancerígena de NS6E en células HeLa.....	162
Tabla 60. Porcentaje de viabilidad de NS6E en células HeLa.....	162
Tabla 61. Resultados de la actividad anticancerígena de NS6E en células MCF7.....	163
Tabla 62. Porcentaje de viabilidad de NS6E en células MCF7.	164
Tabla 63. Citotoxicidad de las porfirinas NS1E-NS6E y THFP en células HeLa.....	165
Tabla 64. IC50 de NS1E-NS6E y THFP en células HeLa sin irradiación.	166
Tabla 65. Citotoxicidad de NS1E-NS6E y THFP en células MCF7.	166
Tabla 66. IC50 de NS1E-NS6E y THFP en células MCF7 sin irradiación.....	167
Tabla 67. Efecto anticancerígeno de NS1E-NS6E y THFP en células HeLa.....	168
Tabla 68. IC50 de NS1E-NS6E y THFP en células HeLa irradiadas.....	169
Tabla 69. Efecto anticancerígeno de NS1E-NS6E y THFP en células MCF7.....	169
Tabla 70. IC50 de NS1E-NS6E y THFP en células MCF7 irradiadas.....	170
Tabla 71. Porphirinas simétricas sintetizadas por el método de Adler.	186
Tabla 72. Reactivos empleados para la síntesis de la porfirina S1E.	187
Tabla 73. Reactivos empleados para la síntesis de la porfirina S2E.	190
Tabla 74. Reactivos empleados para la síntesis de la porfirina S3E.	192

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Diagrama de Jablonski modificado.	9
Figura 2. Estructura del Fotofrin.	15
Figura 3. Estructura base de una porfirina.....	18
Figura 4. Electrones π del macrociclo aromático.....	19
Figura 5. Tipos de porfirinas según sus sustituyentes en la posición <i>meso</i>	20
Figura 6. Estructura de las porfirinas sintetizadas y empleadas como FS.	28
Figura 7. Estructura de las porfirinas sintetizadas por Banfi <i>et.al</i> en el 2006.	30
Figura 8. Porfirinas sintetizadas por Králová y colaboradores. R= CH ₃ , H.	31
Figura 9. 5,10,15,20-tetra(4-metoxifenil)porfirina (TMP)	32
Figura 10. Nonil éster de PpIX.....	33
Figura 11. Fotodegradación de las porfirinas.	47
Figura 12. Morfología de las líneas celulares utilizadas.....	48
Figura 13. Distribución de los compuestos en la placa de 96 pozos.....	51
Figura 14. Distribución de los controles en la placa de 96 pozos.	52
Figura 15. Imagen del proceso de irradiación.....	55
Figura 16. Cromatografía en capa fina de NS1E	62
Figura 17. Espectro UV-Vis de la porfirina NS1E.	64
Figura 18. Espectro de RMN ¹ H (400 Hz, CDCl ₃) de NS1E.	65
Figura 19. Ampliación del espectro de RMN ¹ H de la porfirina NS1E.....	66
Figura 20. Asignación a las señales del espectro de RMN ¹ H de la porfirina NS1E.	68
Figura 21. Espectro de masas (FAB) de la porfirina NS1E.....	69
Figura 22. Cromatografía en capa fina de NS2E	74

Figura 23. Espectro de UV-Vis de la porfirina NS2E.....	75
Figura 24. Espectro de RMN ¹ H (400 Hz, CDCl ₃) de NS2E.....	76
Figura 25. Ampliación del espectro de RMN ¹ H de la porfirina NS2E.....	77
Figura 26. Asignación a las señales del espectro de RMN ¹ H de la porfirina NS2E.	79
Figura 27. Espectro de masas de la porfirina NS2E.....	80
Figura 28. Cromatografía en capa fina de NS3E	85
Figura 29. Espectro UV-Vis de la porfirina NS3E.....	86
Figura 30. Cromatografía en capa fina de NS4E	90
Figura 31. Espectro UV-Vis de la porfirina NS4E.....	92
Figura 32. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de la porfirina NS4E.	93
Figura 33. Ampliación del espectro de RMN ¹ H de la porfirina NS4E.....	94
Figura 34. Asignación a las señales del espectro de RMN ¹ H de la porfirina NS4E.	95
Figura 35. Espectro de masas de la porfirina NS4E.....	96
Figura 36. Cromatografía en capa fina de NS5E	100
Figura 37. Espectro UV-Vis de la porfirina NS5E.....	101
Figura 38. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de la porfirina NS5E.	102
Figura 38. Ampliación del espectro de RMN ¹ H de la porfirina NS5E.....	103
Figura 40. Asignación a las señales del espectro de RMN ¹ H de la porfirina NS5E.	105
Figura 41. Espectro de masas de la porfirina NS5E.....	106
Figura 42. Cromatografía en capa fina de NS6E	110
Figura 43. Espectro UV-Vis de la porfirina NS6E.....	112
Figura 42. Espectro de masas de la porfirina NS6E.....	113
Figura 45. (a) Espectro de absorción de la porfirina A ₄ (<i>p</i> -Clorofenilo) antes y después de la irradiación con lámpara de HAL-TU (500W) (b) Gráfica de diferencia de absorbancia (irradiada menos no irradiada)	117
Figura 46. Fotodegradación de porfirina A ₃ B, NS3E, (5x10 ⁻⁶ g/mL).....	118
Figura 47. Gráfica comparativa de diferencia absorbancia a 2 h de irradiación.	119
Figura 48. Gráfica comparativa de diferencia de absorbancia a 4 h de irradiación.	120

Figura 49. Espectro de absorción de la porfirina A ₄ después de 24h y 48h de la irradiación por 4h con lámpara de HAL-TU de 500W.	122
Figura 50. Fotodegradación de porfirina A ₄ con lámpara de LED de 10W.	123
Figura 51. Fotodegradación de porfirina A ₄ con lámpara de LED de 35W.	124
Figura 52. Gráfica comparativa a las 2 h de irradiación, con diferentes lámparas.	126
Figura 53. Efecto citotóxico de NS1E en células HeLa.	129
Figura 54. Efecto citotóxico de NS1E en células MCF7.	130
Figura 55. Efecto citotóxico de NS2E en células HeLa.	132
Figura 56. Efecto citotóxico de NS2E en células HeLa.	133
Figura 57. Efecto citotóxico de NS3E en células HeLa.	135
Figura 58. Efecto citotóxico de NS3E en células MCF7.	136
Figura 59. Efecto citotóxico de NS4E en células HeLa.	138
Figura 60. Efecto citotóxico de NS4E en células MCF7.	139
Figura 61. Efecto citotóxico de NS5E en células HeLa.	141
Figura 62. Efecto citotóxico de NS5E en células MCF7.	142
Figura 63. Efecto citotóxico de NS6E en células HeLa.	144
Figura 64. Efecto citotóxico de NS6E en células MCF7.	145
Figura 65. Efecto anticancerígeno de NS1E en células HeLa.	148
Figura 66. Efecto anticancerígeno de NS1E en células MCF7.	149
Figura 67. Efecto anticancerígeno de NS2E en células HeLa.	151
Figura 68. Efecto anticancerígeno de NS2E en células MCF7.	152
Figura 69. Efecto anticancerígeno de NS3E en células HeLa.	154
Figura 70. Efecto anticancerígeno de NS3E en células MCF7.	155
Figura 71. Efecto anticancerígeno de NS4E en células HeLa.	157
Figura 72. Efecto anticancerígeno de NS4E en células MCF7.	158
Figura 73. Efecto anticancerígeno de NS5E en células HeLa.	160
Figura 74. Efecto anticancerígeno de NS5E en células MCF7.	161
Figura 75. Efecto anticancerígeno de NS6E en células HeLa.	163
Figura 76. Efecto anticancerígeno de NS6E en células MCF7.	164

Figura 77. Citotoxicidad de NS1E-NS6E y THFP en células HeLa.....	165
Figura 78. Citotoxicidad de NS1E-NS6E y THFP en células MCF7.	167
Figura 79. Efecto anticancerígeno de NS1E-NS6E y THFP en células HeLa.....	168
Figura 80. Efecto anticancerígeno de NS1E-NS6E y THFP en células MCF7.	170
Figura 81. Apoptosis inducida en células HeLa por las porfirinas en estudio.....	179
Figura 82. Apoptosis inducida en células MCF7 por las porfirinas en estudio.	180
Figura 83. Espectro de masas de la porfirina S1E.	189
Figura 84. Espectro de masas de la porfirina S2E.	191
Figura 85. Espectro de masas de la porfirina S3E.	193

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema	Página
Esquema 1. Mecanismo de Rotomskis para la fotooxidación de compuestos.....	14
Esquema 2. Síntesis de porfirinas por el método de Adler.....	22
Esquema 3. Síntesis de porfirinas simétricas por el método de Lindsey.....	24
Esquema 4. Síntesis de porfirinas empleando el método de Adler-Longo.....	26
Esquema 5. Síntesis de porfirinas no simétricas por Banfi y colaboradores.	29
Esquema 6. Síntesis de porfirinas no simétricas tipo A ₃ B por el método de Lindsey.....	44
Esquema 7. Ruta sintética de la porfirina NS1E. Método de Lindsey.....	60
Esquema 8. Ruta sintética de la porfirina NS2E. Método de Lindsey.....	71
Esquema 9. Ruta sintética de la porfirina NS3E. Método de Lindsey.....	82
Esquema 10. Ruta sintética de la porfirina NS4E. Método de Lindsey.....	88
Esquema 11. Ruta sintética de la porfirina NS5E. Método de Lindsey.....	98
Esquema 12. Ruta sintética de la porfirina NS6E. Método de Lindsey.....	108
Esquema 13. Síntesis de porfirinas simétricas por el método de Adler.	186

NOMENCLATURA

WST-1	2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolium.
DDQ	2,3-dicloro-5,6-diciano-benzoquinona.
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.
NS1E	5,10,15-tri(4-clorofenil)-20-(4-metoxifenil)-21H,23H-porfirina.
NS2E	5,10,15-tri(4-clorofenil)-20-fenil-21H,23H-porfirina.
NS3E	5,10,15-tri(4-clorofenil)-20-(4-hidroxifenil)-21H,23H-porfirina.
NS4E	5,10,15-tri(4-metoxifenil)-20-(4-clorofenil)-21H,23H-porfirina.
NS5E	5,10,15-trifenil-20-(4-clorofenil)-21H,23H-porfirina.
NS6E	5,10,15-tri(4-hidroxifenil)-5-(4-clorofenil)-21H,23H-porfirina.
S1E	5,10,15,20-tetrakis(4-clorofenil)-21H,23H-porfirina.
S2E	5,10,15,20-tetrakis(4-metoxifenil)-21H,23H-porfirina.
S3E	5,10,15,20-tetrafenil-21H,23H-porfirina.
THFP	5,10,15,20-Tetrakis (4-hidroxifenil)-21H, 23H- porfirina.
ALA	Ácido 5-aminolevulínico.
TFA	Ácido trifluoroacético.
PBS	Buffer fosfato salino.
FAB	Bombardeo de átomos acelerados.
HCT116	Células de adenocarcinoma de colon humano.
Rf	Constante del factor de retención.
CCF	Cromatografía en capa fina.
DAB	Diaminobencidina.
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno.
UV-Vis	Espectrofotometría Ultravioleta-Visible.

EM	Espectrometría de Masas.
EMAR	Espectrometría de Masas de Alta resolución.
S ₀	Estado basal.
S ₁	Estado electrónicamente excitado.
FDA	Food and Drug Administration.
FS	Fotosensibilizador.
°C	Grados Celsius.
HAL-TU	Halógeno-Tungsteno.
h	Horas.
O ₂ ⁻	Ion superóxido.
LED	Light Emitting Diode, “diodo emisor de luz”
µg	Microgramos.
µL	Microlitros.
mL	Mililitros.
mmol	Milimoles.
nm	Nanómetros.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
¹ O ₂	Oxígeno molecular en estado singulete.
³ O ₂	Oxígeno molecular en estado triplete.
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protón.
s	Segundos.
SSBH	Solución Salina Balanceada de Hank.
TFD	Terapia fotodinámica.
BF ₃ .Et ₂ O	Trifluoruro de boro eterato.
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling.
W	Watts.

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN.

1.1. CÁNCER.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define al cáncer como el término genérico dado a un grupo de más de 100 enfermedades que pueden afectar cualquier parte del organismo.¹ La principal característica del cáncer es el crecimiento descontrolado de células anormales que pueden invadir tejidos y diseminarse a varios órganos a través del torrente sanguíneo o del sistema linfático dando lugar a la metástasis.²

1.2. ESTADÍSTICA A NIVEL MUNDIAL.

En la mayor parte de los países desarrollados el cáncer es la segunda causa principal de mortalidad después de las enfermedades cardiovasculares.³ Este padecimiento fue responsable del 13% de las defunciones mundiales en 2007,

es decir 7.9 millones de las defunciones ocurridas. Se prevé que el número de defunciones por cáncer seguirá aumentando y llegará a unos 12 millones en 2030.¹

Los principales tipos de cáncer que contribuyen a la mortalidad anual mundial¹ son:

Tabla 1. Mortalidad atribuida al cáncer OMS.

Tipo de cáncer	Número de Defunciones
Pulmón	1 400 000
Estómago	866 000
Colon	677 000
Hígado	653 000
Mama	548 999

1.3. ESTADÍSTICA EN MÉXICO.

Respecto a la estadística del cáncer en México, el Instituto Nacional de Cancerología establece que del total de defunciones registradas en el país durante el 2008 (539 530 defunciones) el 13% tuvieron como principal causa al cáncer.³

Estadísticas del INEGI muestran que de 1998 a 2008 las mujeres presentaron los mayores porcentajes de muertes por neoplasia en comparación con los hombres. En 1998 se presenta la mayor brecha, donde las mujeres superan con

4.1% a los varones. Para el 2008 la diferencia observada es menor, con 11.6% y 15.2% de defunciones para hombres y mujeres respectivamente.³

A partir del 2006, el cáncer de mama ocupa el primer lugar como causa de muerte en mujeres.⁵ En segundo lugar se encuentra el cáncer en el cuello del útero, el tercer lugar lo ocupan el cáncer de estómago e hígado, el cuarto sitio el cáncer en vías biliares intrahepáticas y por último los tumores malignos de tráquea, bronquios y pulmón.³

Mientras que para los hombres, la principal causa de muerte son tumores malignos de próstata y tumores malignos de tráquea, bronquios y pulmón.³

1.4. FACTORES CAUSALES DEL CÁNCER.

Existen diversos factores que pueden desencadenar este padecimiento, el cáncer aparece cuando una sola célula acumula varias mutaciones e inicia con la transformación de dicha célula normal, la cual es sometida a un proceso que abarca varias fases hasta que finalmente se convierte en una célula tumoral.¹

Estas modificaciones pueden presentarse por causa de agentes que dañan los genes involucrados en el control de la proliferación celular (proto-oncogenes), los cuales actúan en conjunto con agentes que no dañan los genes pero que

potencian selectivamente el crecimiento de células tumorales.⁶ Lo anterior indica que el desarrollo del cáncer está condicionado a la interacción entre los factores genéticos de la persona y uno o varios agentes externos,¹ algunos de los cuales se muestran en la tabla 2:

Tabla 2. Agentes externos que pueden causar cáncer.

Tipo de agente carcinogénico	Ejemplo
Físico	Luz ultravioleta, radiación ionizante
Químico	Asbesto, humo de tabaco
Biológico	Infecciones causadas por virus (Virus del papiloma humano ^{7,8}), bacterias (<i>Helicobacter pylori</i> ⁹) o parásitos (<i>Esquistosoma haematobium</i> ¹⁰).

Además de los agentes mencionados en la tabla 2, se ha estudiado que existen otros factores de riesgo para contraer el cáncer, como lo son la edad avanzada, factores hormonales y factores dietéticos, los cuales están relacionados con el desarrollo de cáncer de pulmón en pacientes no fumadores.¹¹

1.5. TRATAMIENTOS.

Dentro de los tratamientos empleados actualmente para combatir esta enfermedad se encuentran varias alternativas como:

- a. Quimioterapia.** Esta terapia consiste en la administración de medicamentos los cuales tienen como principal objetivo destruir a las células de rápido crecimiento.¹² El mecanismo de acción consiste en provocar una alteración celular, ya sea en la síntesis de ácidos nucleicos, división celular o afectando la síntesis de proteínas.¹³
- b. Radioterapia.** Es un tratamiento local en donde se somete al paciente a radiaciones con rayos de alta energía provocados por materiales radioactivos, la radiación actúa específicamente dentro de la célula (normal o cancerosa) en la fase en que se multiplica, destruyéndola o impidiendo que se reproduzca. La radioterapia puede ser externa o interna; la externa se efectúa con aparatos que envían la radiación a la zona del tumor y la radioterapia interna emplea un material radiactivo que debe ser administrado al paciente.¹⁴ Este tratamiento puede combinarse ya sea con cirugía o con quimioterapia.^{13, 15}
- c. Cirugía.** Es el método más utilizado para los tumores pequeños y localizados en un lugar concreto. Para que sea completamente eficaz, se precisa extirpar parte del tejido que rodea el tumor para asegurar que todas las células cancerosas han sido extirpadas.¹⁶
- d. Inmunoterapia.** Es una estrategia utilizada para estimular o reponer el sistema inmunitario frente al cáncer ya que los leucocitos pueden ser estimulados para incentivar la respuesta inmune. Existen diferentes anticuerpos que pueden ser administrados y que producen la activación

del sistema inmune.¹³ También se emplea esta terapia para aminorar los efectos secundarios producidos por los otros tratamientos anticancerígenos.¹⁷

e. Terapia Fotodinámica. Es un método terapéutico óptico, mínimamente invasivo que consiste en la administración de un fármaco fotosensibilizador (FS) seguido por la irradiación con luz visible, para que en presencia de oxígeno genere especies reactivas de oxígeno que induzcan la muerte celular y destrucción del tejido.^{18, 19, 20.}

Las terapias mencionadas en los incisos a-d presentan graves efectos adversos y la mayoría de ellas no son selectivas hacia el tejido cancerígeno; es decir, que destruyen tanto a las células sanas como a las células cancerosas. Además, un factor que determina la real efectividad de la cirugía, es la habilidad del cirujano para diferenciar el tejido tumoral del normal, basándose en un criterio subjetivo para la remoción total de las células neoplásicas.²¹

Dentro de los efectos adversos que se pueden presentar al ser administradas las terapias anteriormente mencionadas, se encuentran:

- Náusea y vómito.¹³
- Caída del cabello.¹³
- Fatiga.¹⁴
- Problemas de coagulación por la trombocitopenia.²²

- Anemia debido a la eritropenia.²²
- Inmunosupresión y por tanto infecciones.
- Problemas intestinales y estomacales.
- Llagas en boca, encías y garganta.
- Hepatotoxicidad y nefrotoxicidad.
- Tumores secundarios.²³

Debido a lo anterior surge la necesidad de contar con alternativas que sean efectivas y que además sean selectivas hacia las células cancerígenas y que presenten los menores efectos secundarios posibles. Una opción que cumple con estas características es la Terapia Fotodinámica.

1.6. TERAPIA FOTODINÁMICA.

La terapia fotodinámica (TFD) es una de las técnicas más prometedoras que han sido estudiadas para una variedad de aplicaciones médicas y sobretodo es un tratamiento bien reconocido para la destrucción de tumores.²⁴

La TFD se ha utilizado desde la antigüedad para el tratamiento de diversas enfermedades y desórdenes. Un ejemplo de ello es que en el antiguo Egipto se utilizaba esta terapia para tratar el vitíligo. También existen reportes de que Indios y Griegos empleaban esta terapia, ayudados de *Psoralea corylifolia*, para

el tratamiento de la psoriasis y el vitíligo. En los inicios del siglo XX, se descubrieron las propiedades fotosensibilizantes de acridina al estudiar los efectos producidos en los protozoos.²⁵

La TFD es una terapia anticancerígena que mata células cancerosas mediante la generación fotoquímica de especies reactivas de oxígeno (ERO) tras la absorción de luz visible por un fotosensibilizador (FS) el cual se acumula selectivamente en células tumorales.²⁶ Dicha localización y biodistribución del FS en el tejido tumoral, depende de varios factores como son la lipofilicidad, pH, drenaje linfático, unión a lipoproteínas, agregación, carga molecular y el potencial de membrana de las células tumorales. Muchos blancos subcelulares pueden ser atacados durante la TFD, incluyendo mitocondrias, lisosomas, membrana plasmática y núcleo; este último organelo es el blanco exacto, pues determina si la muerte celular será mediante necrosis o apoptosis.²⁷

La destrucción del tejido por la TFD requiere de oxígeno molecular e involucra la generación de ERO que pueden matar la célula blanco o destruir el endotelio vascular celular. Se ha observado que la apoptosis es la principal forma de muerte celular, aunque en la TFD también se ha observado autofagia o necrosis dependiendo del FS, la dosis de la TFD, la localización del FS, el potencial metabólico celular y el genotipo celular.²⁶

Existen tres factores involucrados en la TFD para combatir el cáncer: el fármaco FS, la aplicación de luz visible o del infrarrojo cercano y la presencia de oxígeno molecular. Cada uno es inofensivo por sí solo, pero al combinarlos producen agentes citotóxicos letales que pueden destruir las células neoplásicas.²⁷

1.6.1. MECANISMO DE ACCIÓN.

Los principios fotoquímicos y fotofísicos de la TFD han sido estudiados y representados esquemáticamente mediante una modificación del diagrama de Jablonski²⁷ (Figura 1).

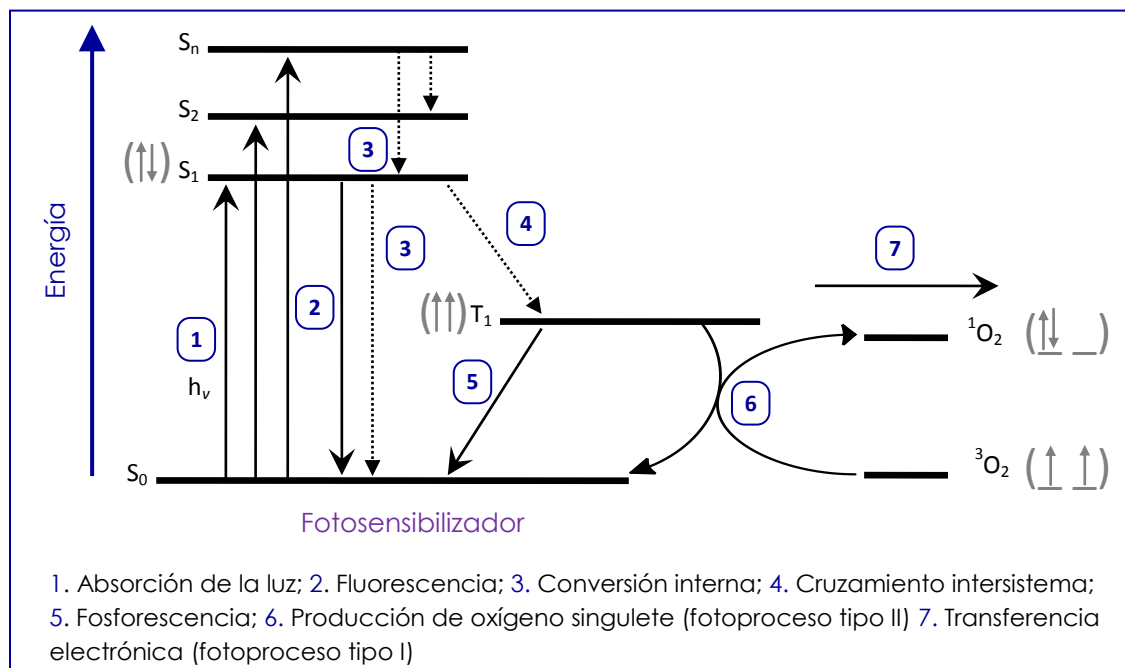


Figura 1. Diagrama de Jablonski modificado.
Transiciones electrónicas asociadas a los agentes fotodinámicos.

Una vez que el FS es irradiado, pasa de un estado basal (S_0) a un estado electrónicamente excitado (S_1) de tiempo de vida corto [$\sim 10^{-6}$ s], posteriormente regresa a su estado basal (S_0) de menor energía. Un buen FS irá a ese estado mediante un cruzamiento intersistema mostrado en el número 4 del diagrama, lo cual involucra la inversión del espín, convirtiendo al FS en el estado triplete (T_1 , 10^{-2} s) con alta eficiencia.

En ambientes donde el oxígeno se encuentra presente, el FS puede dirigirse hacia un proceso fotoquímico tipo II, en el cual se involucra una transferencia de energía entre el estado triplete excitado del FS y el estado basal del oxígeno (3O_2) produciendo un estado excitado altamente reactivo y con un tiempo de vida corto, el oxígeno singulete (1O_2). El oxígeno singulete es un zwitterion altamente polarizado y es considerado como un buen agente citotóxico.

El proceso de tipo I involucra un sistema de transferencia de electrones donde el estado triplete del FS interactúa con el sustrato biológico produciendo la formación de radicales y iones radicales los cuales al interactuar con moléculas de oxígeno pueden originar especies citotóxicas como ion superóxido (O_2^-), tal como se muestra en el número 7 del diagrama. Aunque ambos tipos de procesos pueden presentarse, se ha demostrado que el mecanismo del tipo II es el que predomina durante la TFD, aunque se ha encontrado que en

concentraciones bajas de oxígeno el mecanismo del tipo I juega un papel importante.²⁷

La absorción de un fotón ($h\nu$) es un evento que ocurre rápidamente, en el orden de 10^{-15} s y la excitación electrónica ocurre antes de cualquier cambio en la posición relativa de los átomos en la molécula (vibración), efecto llamado Franck-Condon. La excitación electrónica que se produce en el estado excitado de la molécula es rápidamente seguida por su relajación vibracional (vr) hasta adoptar una geometría de mínima energía.²⁸

Las moléculas existen en el estado fundamental energético más favorable, en el cual los electrones (designados con espín $+1/2$ y $-1/2$) normalmente se aparean de forma que la suma de todos los números de espín cuántico es cero.

Para los FS la absorción de un fotón produce un estado singulete excitado (S_1), si son usados fotones con mayor energía en el proceso de excitación, es posible generar el estado excitado de mayor energía (S_2), pero en general una rápida relajación ocurre entre los estados singuletes, mediante un proceso llamado conversión interna (número 3 del diagrama) hacia el estado singulete de menor energía (S_1). Éste tiene un tiempo de vida más larga que un estado excitado de mayor energía, debido a que existe una mayor separación entre la energía de éste y el estado basal (S_0). Una vía de relajación de los agentes

fotodinámicos es un cambio en el espín de un electrón excitado para generar un estado triplete, donde los dos electrones desapareados tienen ahora el mismo espín, la suma del espín es 1, y la multiplicidad resultante es 3. Esto es lo contrario del proceso de S_1-S_0 en donde la transición es desfavorecida sobre la base de la multiplicidad de espín, pero mucho más favorecida a causa de la brecha de energía mucho menor entre el estado S_1 y T_1 . El estado triplete de menor energía producido (T_1) es el estado más importante en el proceso fotodinámico.²⁸

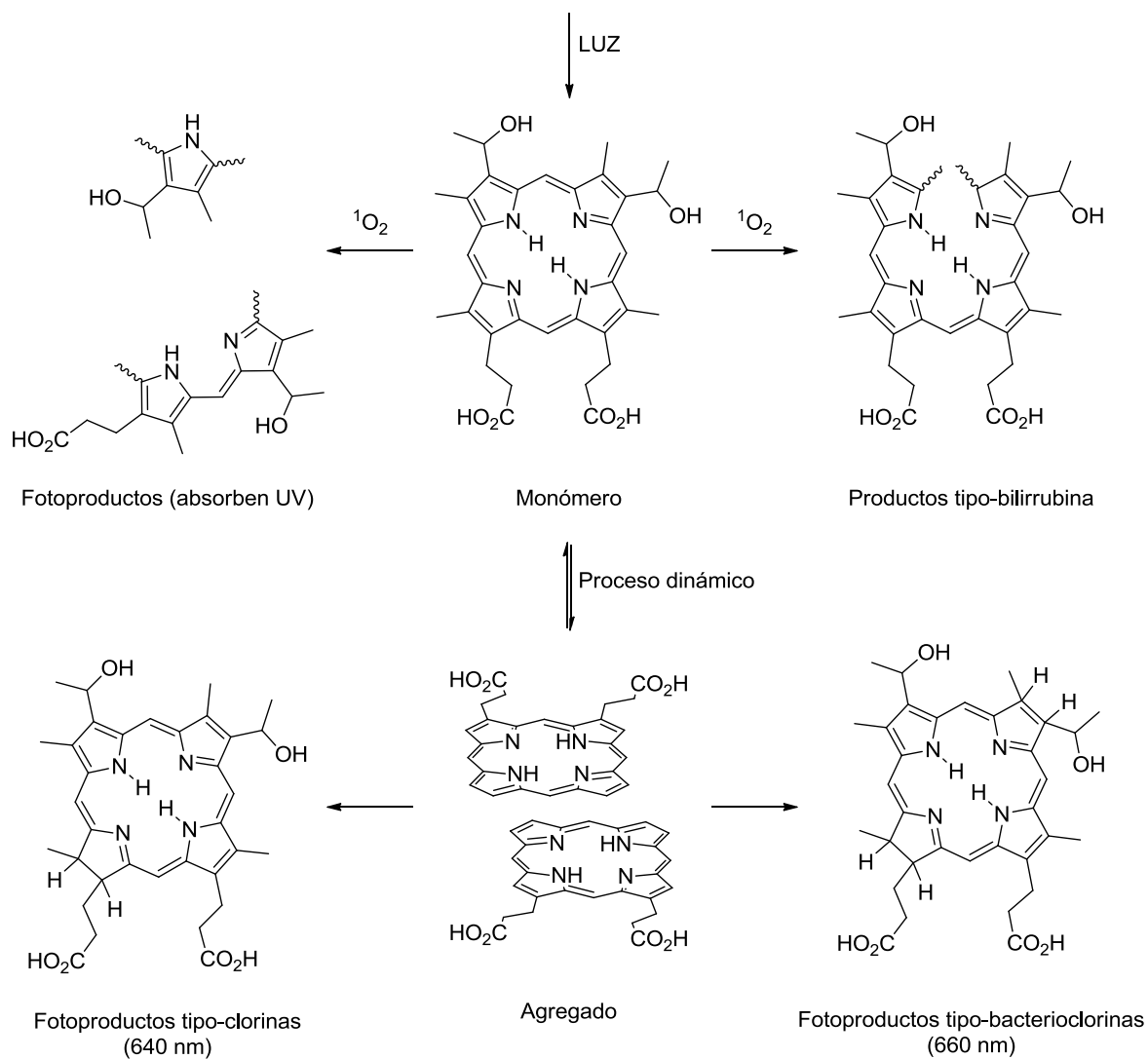
1.7. FOTODEGRADACIÓN.

La fotodegradación de los compuestos tetrapirrólicos ha sido importante debido a sus diversas aplicaciones,²⁷ dentro de esta área de estudio, el término fotoblanqueo, mejor conocido por el término en inglés “photobleaching”, involucra la pérdida de la intensidad de la absorción o emisión causada por la exposición a la luz de agentes fotosensibilizadores tanto en tejidos y células, como en solución.

Existen dos tipos de “photobleaching” irreversible que dan como resultado un cambio químico en el cromóforo.²⁹

- a) Fotomodificación, en la cual la pérdida de fluorescencia o absorbancia ocurre a algunas longitudes de onda, pero el cromóforo es retenido en una forma modificada (Esquema 1).^{30, 31}
- b) “Photobleaching” verdadero, en el cual se observan cambios químicos y se tienen como resultado de la irradiación, pequeños fragmentos que no tienen absorción apreciable en la región visible. Además, la muestra se vuelve esencialmente incolora.

El “photobleaching” de los fotosensibilizadores durante la terapia fotodinámica se ha observado tanto en células *in vitro* como en piel *in vivo*, utilizando la observación por fluorescencia tanto directamente como después de la extracción del pigmento para determinar esta propiedad. A pesar de que el “photobleaching” puede ser considerado como una propiedad del fotosensibilizador que presenta desventajas debido a la destrucción o modificación estructural de la especie activa, es importante considerar el estudio de esta propiedad para proyectar los beneficios potenciales del fotosensibilizador a utilizar, por ejemplo, en relación al tiempo de exposición necesario para la activación de los sensibilizadores, la dosis adecuada, o simplemente para corroborar que en realidad los compuestos estudiados presentan una respuesta en presencia de luz visible.



Esquema 1. Mecanismo de Rotomski para la fotooxidación de compuestos.

1.8. FOTSENSIBILIZADORES.

Un FS normalmente es administrado empleando un buffer de solución acuosa o liposomas; mientras que, la luz es generada por un láser sencillo y económico, el cual puede ser producido por una luz monocromática que se

puede canalizar de manera eficiente en cables de fibra óptica y se pueden dirigir al sitio de tratamiento mediante el uso de un endoscopio con buena precisión.²⁷

Al inicio de la TFD se emplearon derivados de hematoporfirina y otras preparaciones derivadas de ella, los cuales fueron llamados Fotosensibilizadores de primera generación. En 1993, en Canadá se aprobó el primer FS para ser utilizado en la TFD, el cual es una forma purificada de derivados de hematoporfirina, este FS se componía de mezcla de porfirinas¹⁹. Esta mezcla contenía hidroxietilvinildeuteroporfirina y protoporfirina, además de la hematoporfirina; una de las características de este FS es que absorbe poca radiación aproximadamente a 630 nm y se utilizó para el tratamiento del cáncer de esófago y pulmón.²⁰ El FS mencionado anteriormente es llamado Fotofrin (Figura 2), el cual fue aprobado por la FDA³² y es utilizado en la TFD en Canadá, Holanda, Japón, Francia, Italia y Estados Unidos.²⁷

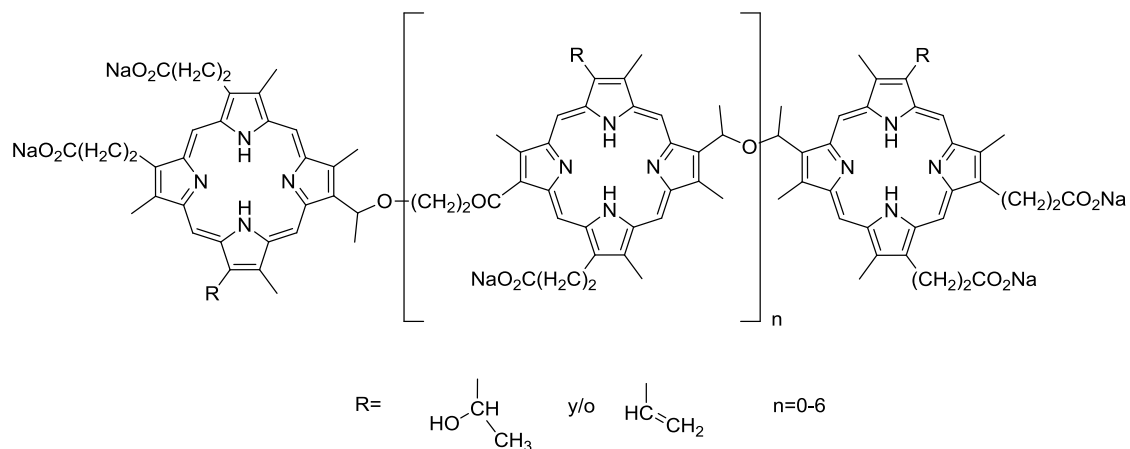


Figura 2. Estructura del Fotofrin.

Debido a las características que estos FS poseían, los investigadores se dieron a la tarea de encontrar FS más potentes, eficaces, con mayor penetración y absorción de luz roja, con la finalidad de proporcionar un tratamiento con mayor efectividad y con menores efectos adversos. A continuación se presentan algunas de las propiedades esenciales para un FS ideal: ^{27,35}

- a) Debe ser químicamente puro y su composición debe ser específicamente conocida; fácilmente sintetizable, reproducible, estable y que sus precursores se encuentren disponibles.
- b) Debe tener alto rendimiento cuántico para la producción de oxígeno singlete y garantizar la destrucción de las células tumorales.
- c) Debe tener fuerte absorción con alto coeficiente de extinción (ϵ) a mayor longitud de onda, en la región del rojo, preferentemente entre 700-800 nm, lo que favorece a una mayor penetración en el tejido. Y suficientemente energético para la producción necesaria de oxígeno singlete.
- d) Debe tener excelente reactividad fotoquímica con elevado rendimiento del estado triplete y un largo tiempo de vida. Debe ser capaz de producir efectivamente oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$).

- e) Debe poseer toxicidad mínima en la oscuridad y solamente presentar citotoxicidad en presencia de luz.
- f) Debe tener retención preferentemente al tejido blanco (células neoplásicas).
- g) Debe ser eliminado rápidamente para disminuir la toxicidad sistémica.
- h) Debe disolverse fácilmente en los fluidos corporales.

Desafortunadamente no existe un FS que posea todas las características anteriores; sin embargo, se debe hacer un esfuerzo en que se cumpla la mayoría de las propiedades que requiere un FS efectivo.²⁷

Posteriormente, aparece la segunda generación de FS, pertenecientes al tipo tetrapirrólicos los cuales tienen periodos más cortos de fotosensibilización y presentan una mejor absorción de la luz a longitudes de onda más largas, característica que les permite incrementar la profundidad a la cual puede ser aplicada la TFD, rendimientos más altos de producción de oxígeno singulete y selectividad tumoral.³³ Algunos FS de segunda generación descritos en la literatura son las porfirinas, clorinas, bacterioclorinas y las ftalocianinas, de las cuales las porfirinas han sobresalido actualmente como eficaces agentes fototerapéuticos.³⁴

1.9. PORFIRINAS COMO FOTOSENSIBILIZADORES.

Los sistemas en base a porfirinas en general cumplen la mayoría de las características enlistadas anteriormente. La estructura básica de una unidad de porfirina está constituida por cuatro subunidades de pirrol unidas entre sí por grupos metino, para formar un macrociclo tetrapirrólico (Figura 3).³⁵

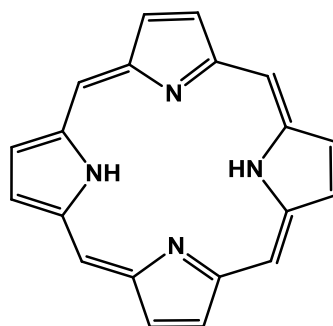


Figura 3. Estructura base de una porfirina.

Debido a su extensa conjugación, la molécula de porfirina es fluorescente y puede ser excitada por luz visible para producir estado triplete que tiene un estado singulete con un corto tiempo de vida. Además, las porfirinas no presentan efectos tóxicos en los pacientes en ausencia de luz visible. Por estas razones, varios compuestos porfirínicos se encuentran actualmente en distintas fases de ensayos clínicos como agentes fotodinámicos.³⁵

Para lograr el efecto fotodinámico deseado, el FS en activación con una apropiada longitud de onda debe producir un alto rendimiento cuántico de oxígeno singlete; en general, las porfirinas satisfacen esta demanda. Las porfirinas y los sistemas tetrapirrólicos relacionados son de los compuestos más ampliamente estudiados de todos los compuestos macrocíclicos. Una de las características de las porfirinas es que poseen 22 electrones π en el macrociclo aromático (Figura 4), lo cual les confiere características ópticas con fuertes transiciones π - π^* alrededor de los 400nm (banda Soret) y regularmente cuatro bandas Q en la región visible.³⁵

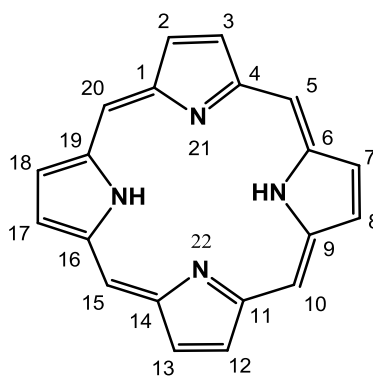


Figura 4. Electrones π del macrociclo aromático.

La síntesis de porfirinas se ha descrito con anterioridad y consiste básicamente en la reacción entre pirrol y un aldehído aromático bajo condiciones específicas dependiendo del método de síntesis utilizado. Se han reportado una gran cantidad de estudios en los cuales se describe la

metodología experimental para la síntesis de diferentes tipos de porfirinas, entre los cuales se destacan A_4 , A_2B_2 , A_3B y $ABCD$ (Figura 5), dependiendo de la disposición de los sustituyentes en las posiciones *meso* de la porfirina³⁶.

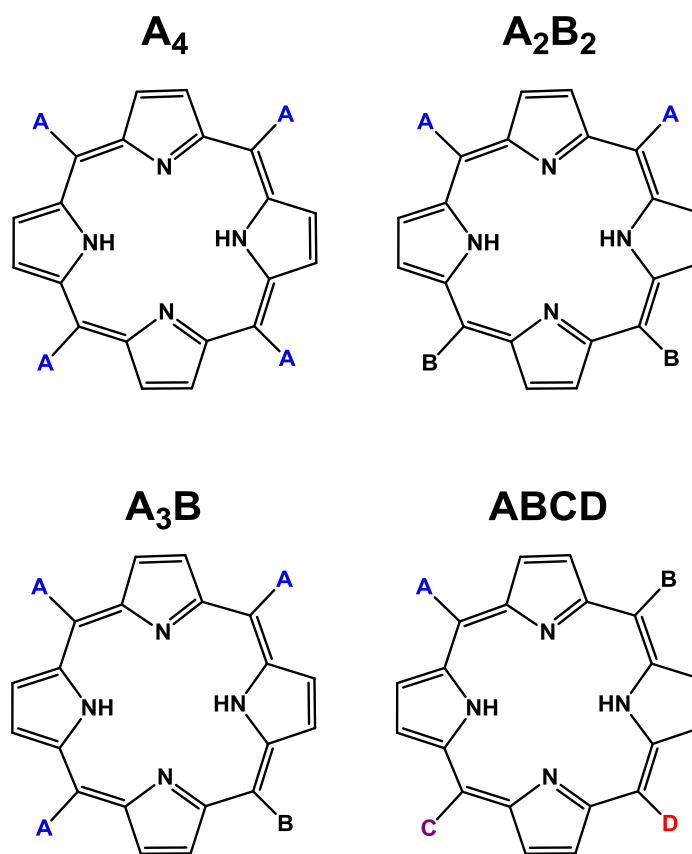


Figura 5. Tipos de porfirinas según sus sustituyentes en la posición *meso*.

Particularmente, la síntesis de porfirinas del tipo A_3B representa un área de oportunidad para la obtención de nuevos compuestos con potencial aplicación como fotosensibilizadores, ya que existen reportes en donde se ha concluido con resultados satisfactorios al respecto;²⁰ sin embargo, el número de estos reportes es limitado para

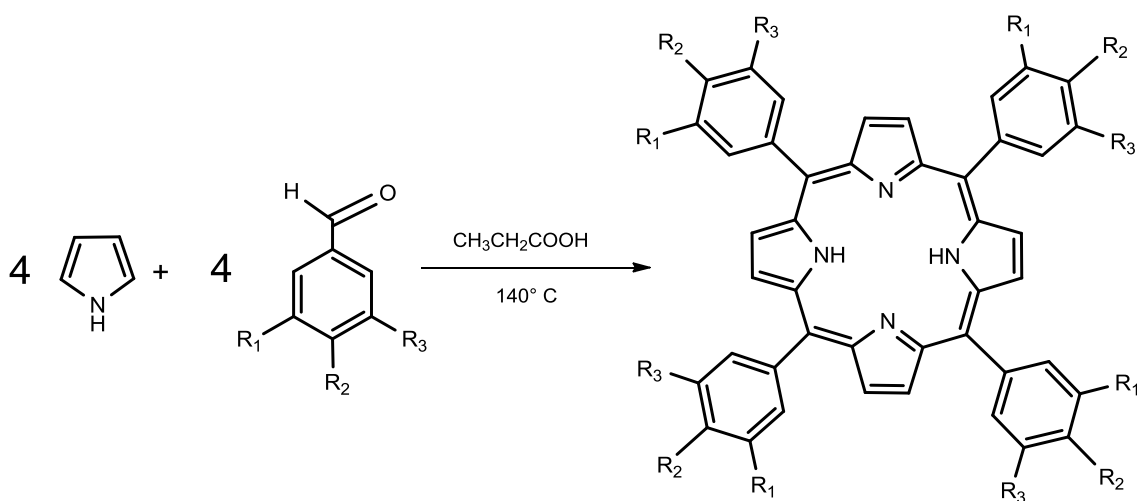
este tipo de porfirinas. Por lo anterior, el presente proyecto plantea realizar la síntesis y caracterización de nuevas porfirinas A₃B y el estudio de su actividad anticancerígena *in vitro*, con la finalidad de ofrecer nuevas opciones de FS potenciales para el tratamiento del cáncer.

CAPÍTULO 2.

ANTECEDENTES.

2.1 SÍNTESIS ORGÁNICA.

Desde principios del siglo pasado, se han reportado síntesis de porfirinas utilizando diferentes rutas sintéticas, partiendo de un principio básico, la reacción entre el pirrol y un aldehído aromático. En 1967, Adler empleó cantidades equimolares de pirrol y aldehído en ácido propiónico, llevando a cabo la reacción a 140°C por 1 o 2 h (Esquema 2).³⁷



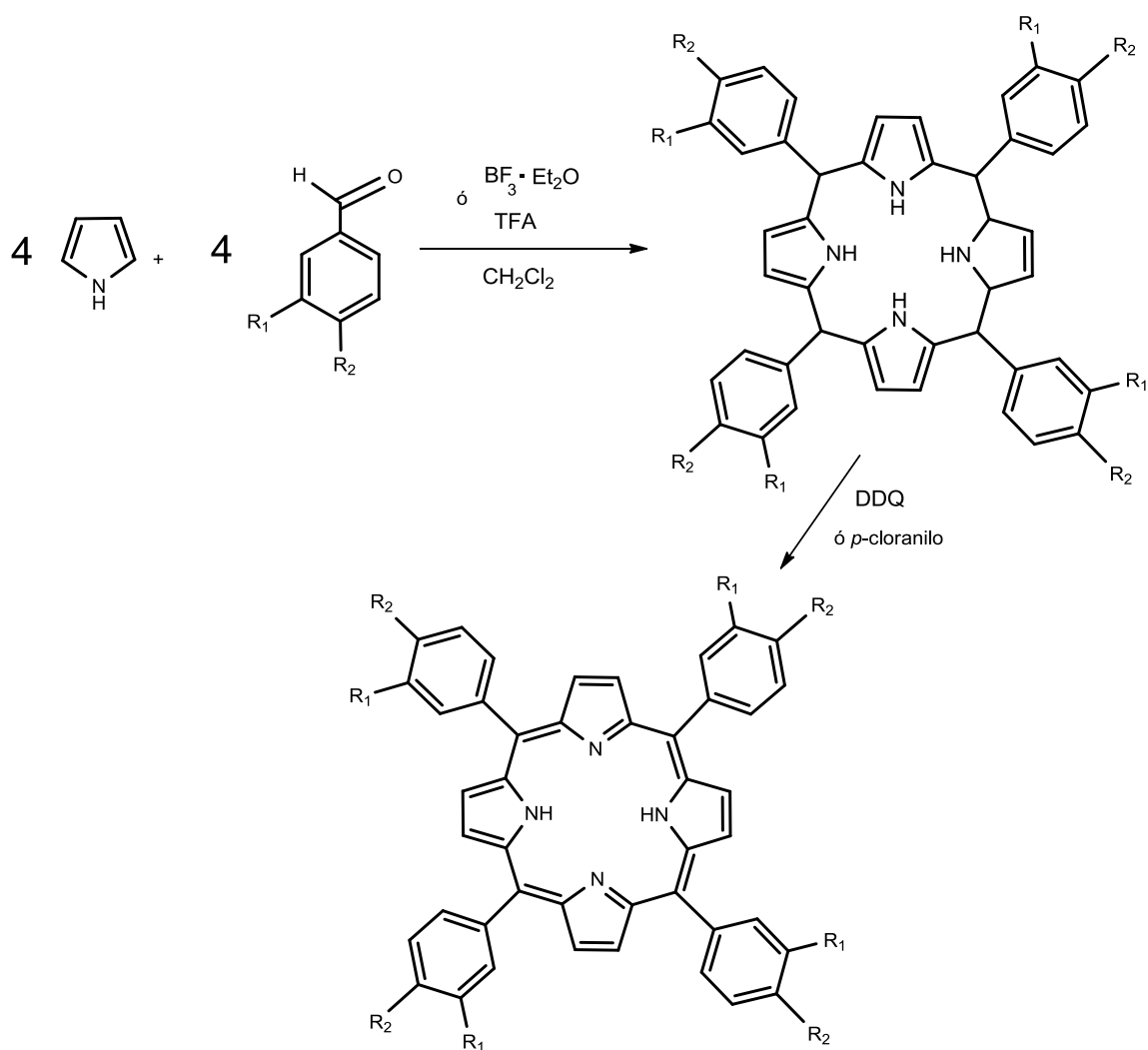
Esquema 2. Síntesis de porfirinas por el método de Adler.

El producto obtenido se observó como un sólido color morado, el cual precipitó al mantener la mezcla de reacción en baño de hielo y añadiendo metanol frío. Para su purificación, el producto era sometido a una serie de lavados para eliminar impurezas, logrando rendimientos entre el 10 y 20%. Este método en la actualidad sigue siendo utilizado para la síntesis de diversas porfirinas con diferentes sustituyentes en las posiciones *meso*.³⁷

En 1987, Lindsey propuso una modificación a la síntesis descrita por Adler ya que estableció que las condiciones de reacción empleadas por este investigador son drásticas para benzaldehídos, que se presentan problemas de purificación con porfirinas que no cristalizan o no precipitan al final de la reacción y que en algunos casos su reproducibilidad es muy baja.³⁸

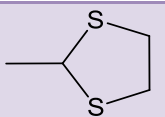
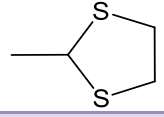
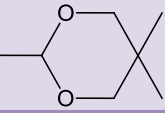
Debido a lo anterior, Lindsey propone una nueva ruta sintética para obtener porfirinas, en la cual el pirrol reacciona con un aldehído a temperatura ambiente utilizando catálisis ácida. Bajo estas condiciones se favorece la formación del porfirinógeno, intermediario de la reacción, el cual es oxidado con el 2,3-dicloro-5,6-diciano-benzoquinona (DDQ) para obtener la porfirina deseada (Esquema 3, Tabla 3).

Lindsey y colaboradores evaluaron diferentes condiciones de reacción y concluyeron que el rendimiento obtenido es dependiente de una variedad de factores como la elección del oxidante (DDQ mejor que *p*-cloranilo), la duración del periodo de condensación, la concentración del pirrol y de los aldehídos (mejor en condiciones equimolares), así como también la presencia de agua en el solvente.³⁸



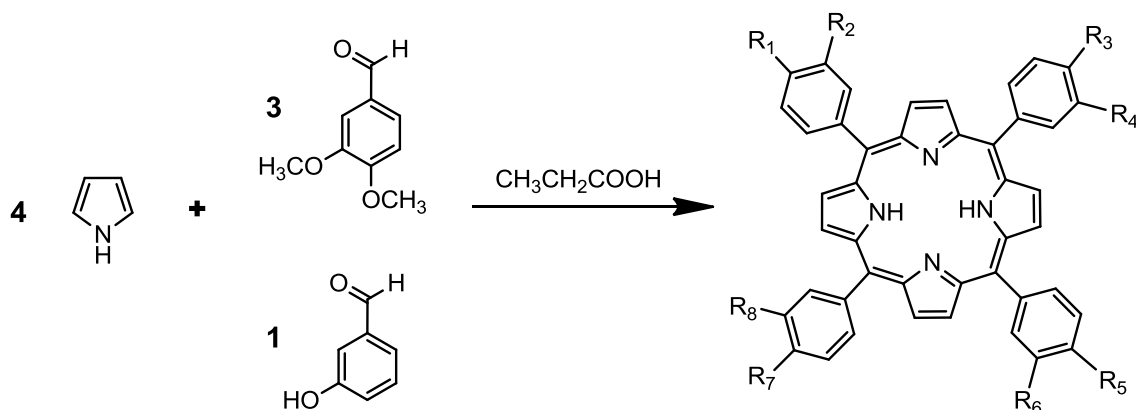
Esquema 3. Síntesis de porfirinas simétricas por el método de Lindsey.

Tabla 3. Porfirinas sintetizadas por Lindsey.

Porfirina	R ₁	R ₂
1	H	O(CH ₂) ₇ CH ₃
2	H	OCH ₂ C ₆ H ₅
3	H	O(CH ₂) ₂ Cl
4	H	CN
5	H	CO ₂ CH ₂ COC ₆ H ₅
6	CO ₂ CH ₂ COC ₆ H ₅	H
7	H	
8		H
9	H	
10	H	OCH ₂ CH=CH ₂
11	H	CO ₂ (CH ₂) ₃ CH ₃
12	H	CO ₂ CH ₃

En 2007, Fagadar y colaboradores realizaron la síntesis de seis porfirinas para aplicarlas como agentes fotosensibilizadores potenciales, entre las que se destacan dos *meso* tetrafenilporfirinas no simétricas A₃B con grupos metoxilo e hidroxilo en los sustituyentes *meso*, derivadas de la combinación de 3-hidroxi y 3,4-dimetoxibenzaldehído utilizados como materias primas de la síntesis. Esta serie de porfirinas fueron sintetizadas por el método de Adler-Longo (Esquema 4, Tabla 4), en el que dos aldehídos diferentes fueron utilizados

simultáneamente llevando a cabo la reacción en medio ácido y usando anhídrido propiónico para capturar el agua generada durante la reacción, pese a esta modificación se alcanzaron bajos rendimientos (7%).



Esquema 4. Síntesis de porfirinas empleando el método de Adler-Longo.

Tabla 4. Porphirinas sintetizadas por Fagadar y colaboradores (*A₃B).

Porfirina	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
*13	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OH
14	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
15	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	OH	H
16	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	H
*17	H	OH	H	OH	H	OH	OCH ₃	OCH ₃
18	H	OH	H	OH	OH	H	OH	H

Sin embargo, este grupo de investigación no realizó las pruebas biológicas que comprobaran el efecto de estos productos como potenciales FS, pero evaluaron su capacidad de permanecer en un medio ácido; con la premisa que en los tejidos

cancerígenos el medio es más ácido que en los tejidos normales y que una molécula hidrofílica se acumula principalmente en los lisosomas donde el medio es ácido. Encontraron que la capacidad de estas porfirinas de existir en forma protonada es similar para los 6 compuestos y presentaron diferentes espectros de absorción de la porfirina 17 a diferentes valores de pH. Mostraron que al incrementar la acidez a un pH ≤ 4 el espectro de absorción de la porfirina se ve modificado, la banda Soret se divide en dos bandas individuales y las bandas Q se reducen solo a una; esto es debido a que a pH ácido, dos protones adicionales se enlazan en los átomos de nitrógeno del anillo porfirínico.²⁰

2.2 SÍNTESIS ORGÁNICA Y PRUEBAS BIOLÓGICAS.

En 2004, Banfi y colaboradores sintetizaron metoxi- e hidroxiporfirinas mediante condensación de un aldehído aromático con pirrol siguiendo el método general descrito por Lindsey, con rendimientos entre el 22 y 41%.

Los ensayos de citotoxicidad fueron realizados empleando el método de MTT en cultivos de líneas celulares de adenocarcinoma de colon humano (HCT116), reportaron curvas de dosis/respuesta obtenidas de las líneas celulares expuestas a diferentes porfirinas. Utilizaron 5×10^4 células/mL, las cuáles sembraron en placas de 96 pozos, las dejaron crecer por 48h y posteriormente dejaron las células en contacto con los compuestos por 24 h. Reemplazaron el medio con el FS por PBS IX e irradiaron con luz

visible (lámpara de halógeno 500W) por 2 h, después de la irradiación incubaron las células con medio de cultivo libre de FS por 24h y realizaron el ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) para determinar la viabilidad celular. Evaluaron la citotoxicidad intrínseca de los compuestos al omitir el paso de irradiación del protocolo descrito.

Sus resultados mostraron una mayor potencia en las porfirinas* con sustituyentes en la posición *meso*: 3,4,5-trimetoxifenilo, 3-hidroxifenilo y 4-hidroxifenilo (Tabla 5, Figura 6) en comparación con Fotofrin (*Porfirmer sodium*), uno de los primeros FS aprobados y empleados para el tratamiento del cáncer. Los estudios de citometría de flujo y microscopía electrónica indicaron que la muerte celular ocurre principalmente por apoptosis.¹⁹

Tabla 5. Radicales de las porfirinas sintetizadas por Banfi y colaboradores en 2004.

Porfirinas	R ₁	R ₂	R ₃
19	OCH ₃	H	H
20	H	OCH ₃	H
21*	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
22	H	SO ₂ AEE**	H
23*	OH	H	H
24*	H	OH	H
25	OH	OH	OH

**SO₂AEE= SO₂NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OH

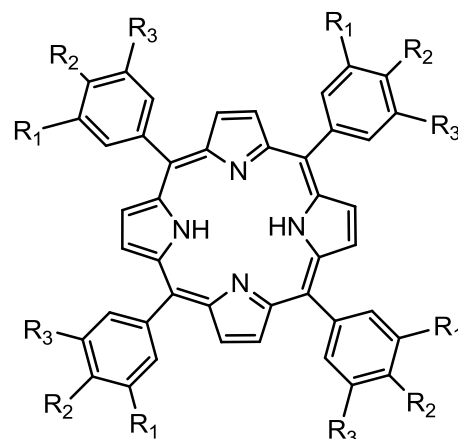
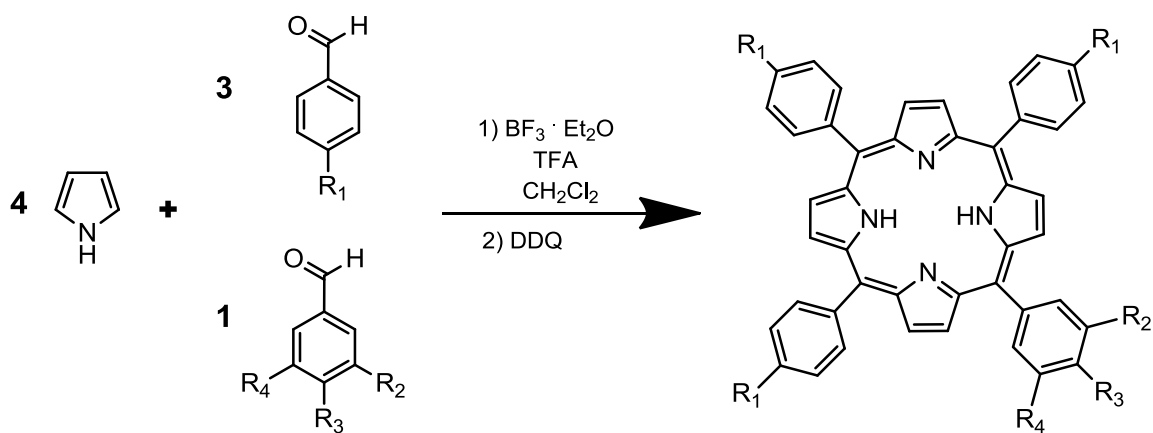


Figura 6. Estructura de las porfirinas sintetizadas y empleadas como FS.

Posteriormente, en 2006 este mismo grupo de investigación sintetizó diaril- y tetraarilporfirinas no simétricas A₃B (metoxi- e hidroxiporfirinas) mediante la condensación del pirrol con dos diferentes aldehídos aromáticos, siguiendo el procedimiento descrito por Lindsey donde el intermediario de la reacción, el porfirinógeno, es oxidado a porfirina con DDQ; para estas síntesis reportan rendimientos entre el 10 y 20% (Esquema 5).



Esquema 5. Síntesis de porfirinas no simétricas por Banfi y colaboradores.

A estas porfirinas les realizaron modificaciones, basados en la hipótesis que afirma que la presencia de grupos fenilo con diferentes sustituyentes en la posición *meso* afectará el carácter hidrofóbico/hidrofílico del FS, la cual es una característica crucial para la penetración y localización celular (Tabla 6, Figura 7).

Tabla 6. Radicales de las porfirinas sintetizadas por Banfi *et.al* en el 2006.

Porfirina	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
26	H	H	OCH ₃	H
27	H	OCH ₃	H	H
28	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
29	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
30	H	H	OH	H
31	H	OH	H	H
32	H	OH	OH	OH

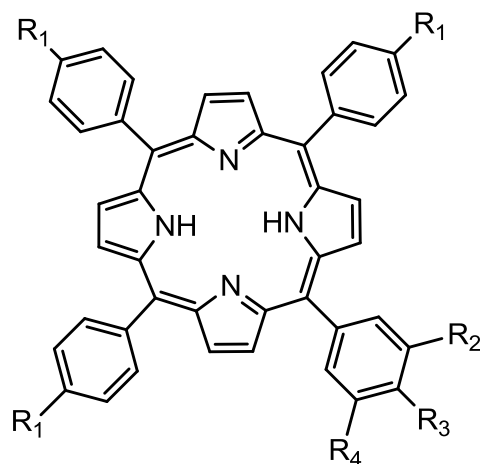


Figura 7. Estructura de las porfirinas sintetizadas por Banfi *et.al* en el 2006.

Las pruebas biológicas las realizaron en cultivos de líneas celulares de adenocarcinoma de colon humano (HCT116), utilizando el mismo protocolo que reportaron en el 2004, empleando MTT para determinar la viabilidad celular después de aplicar la TFD.

La conclusión a la que llegaron fue que las porfirinas con carácter anfífilico y una distribución no simétrica de los sustituyentes presentan una mayor penetrabilidad y localización celular.³³ Este estudio representa un antecedente crucial en la justificación para el planteamiento de las tetraarilporfirinas no simétricas que serán el objeto de estudio del presente proyecto.

En 2008, Králová y colaboradores realizaron el diseño y la síntesis de porfirinas fusionadas con cadenas de glicol unidas a través de enlaces éter a la posición *meta*-fenil del grupo *meso* en una tetrafenilporfirina (Figura 8). Establecieron que la captación celular y la actividad fotodinámica dependen significativamente de los grupos terminales de los sustituyentes de glicol. Porfirinas hidroxi-glicol, en contraste con metoxi-glicol porfirinas, muestran el transporte intracelular eficiente y una alta inducción de la apoptosis en líneas celulares tumorales *in vitro*. Esta aportación es de utilidad para el planteamiento del presente proyecto, ya que se llevarán a cabo síntesis de porfirinas A₃B tanto hidroxi- como metoxisustituidas, pudiendo comparar su actividad *in vitro* como fotosensibilizadores, teniendo como antecedente que las hidroxiporfirinas poseen mejor penetrabilidad celular que las metoxisustituidas.³⁹

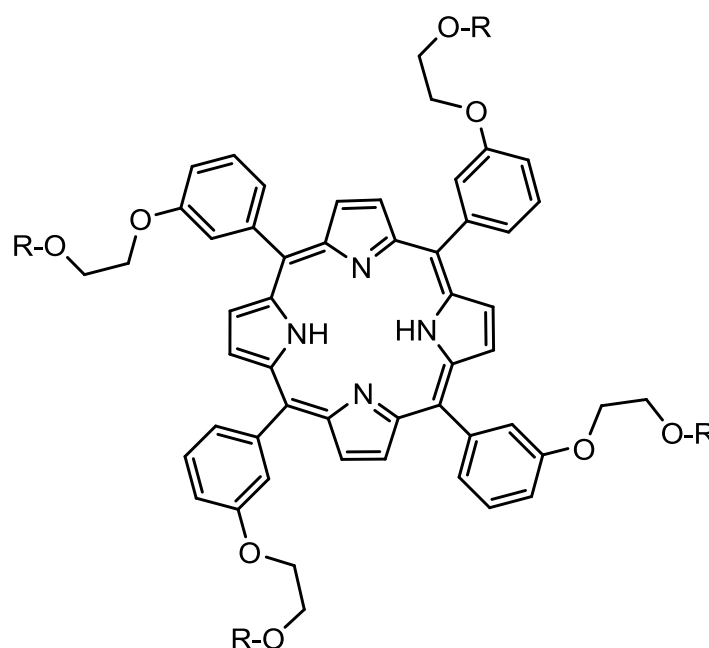


Figura 8. Porfirinas sintetizadas por Králová y colaboradores. R= CH₃, H.

2.3 FOTSENSIBILIZADORES.

En 2000, Álvarez y colaboradores reportaron un procedimiento para visualizar el efecto fotodinámico de las porfirinas utilizando 5,10,15,20-tetra(4-metoxifenil)porfirina (TMP) como FS (Figura 9), adicionaron $1\mu\text{M}$ de TMP a un cultivo de línea celular Hep-2 e incubaron durante 24 h. Posteriormente, realizaron una irradiación de los cultivos celulares durante 30 min y reportaron un 90% de mortalidad celular para los cultivos en los que se agregó la TMP y se sometió a irradiación.

El porcentaje de viabilidad celular fue determinado mediante Microscopía óptica empleando azul de tripán. No observaron citotoxicidad en condiciones en las cuales el TMP era adicionado permaneciendo en la oscuridad y tampoco en donde el cultivo se sometía a irradiación sin adicionar el FS. Finalmente, concluyen que esta metodología puede ser utilizada para probar el efecto de los FS como el TMP en la TFD.³⁴

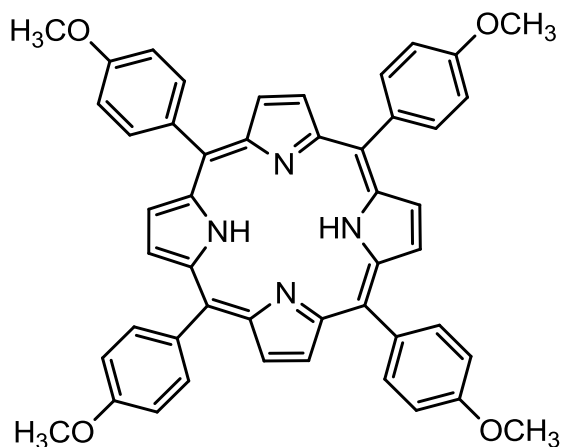


Figura 9. 5,10,15,20-tetra(4-metoxifenil)porfirina (TMP)

Ramón y colaboradores en 2007, sintetizaron un éster de protoporfirina IX (PpIX) el cual aumentó la permeabilidad hacia células cancerígenas en comparación con la sal disódica de PpIX. Aplicaron TFD utilizando el éster de PpIX (Figura 10) y la sal disódica obteniendo mejores resultados para el caso del éster de PpIX. Determinaron la efectividad de la TFD por el alto porcentaje de muerte producido, empleando la técnica del rojo neutro. Reportaron un porcentaje de muerte celular de 97% en células cancerígenas de cérvix previamente tratadas con ácido 5-aminolevulínico (ALA). En estos experimentos emplearon el ALA, para inducir la formación de la PpIX. Cuando emplearon PpIX-EST, obtuvieron un porcentaje de mortalidad de 69%.

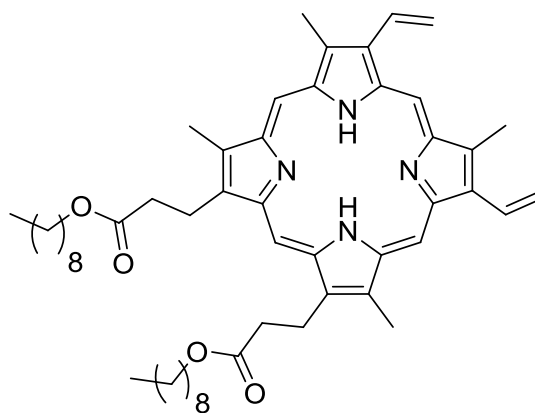


Figura 10. Nonyl éster de PpIX.

Finalmente, determinaron que la apoptosis es el tipo de muerte celular inducida con este FS y que el proceso de esterificación de la SD-PpIX ocasiona que la molécula sea más liposoluble, lo que le permitió una mayor acumulación en las células cancerosas.⁴⁰

Esto último indica de manera general, que una modificación en los sustituyentes de la porfirina puede presentar variaciones favorables con respecto a su afinidad por las células cancerosas, lo cual ha sido parte medular en el planteamiento de las porfirinas que se sintetizaron en el presente proyecto.

En 2009, Panzarini y colaboradores utilizaron el Acetato de Rosa de Bengala (RBAC) como fotosensibilizador y un emisor de luz verde e investigaron la eficacia con la que se induce la apoptosis en células HeLa, centrando el estudio en la alteración mitocondrial y la liberación de citocromo C. Mencionan que RBAC es un sustrato fluorogénico muy eficiente y que entra fácilmente en las células. Una vez dentro, la molécula original RBAC fotoactiva es modificada por las esterasas que quitan el grupo acetato y dejan libre al Rosa de Bengala (RB). Ellos reportan que el RBAC utilizado en la TFD como FS es capaz de inducir apoptosis debido a que experimenta el proceso de excitación de un FS produciendo oxígeno singulete con una alta eficiencia.

En su investigación mencionan que la apoptosis es altamente inducida por la TFD aunque la necrosis, o una combinación de ambas también puede ser producida. Sin embargo, en los experimentos realizados encontraron que en presencia de ambas formas de muerte celular, predomina la apoptosis.

Demostraron que la activación de los FS generalmente promueve alteraciones funcionales de las mitocondrias y la consiguiente liberación de citocromo C que a su

vez, induce la cascada de activación de las caspasas lo que conduce a la inducción de apoptosis. Mencionan que en los experimentos realizados después de 1 h de irradiación, se observó el aumento de la concentración del citocromo C en el citosol y la disminución de la fracción mitocondrial.

Finalmente concluyen que el creciente interés en la TFD como un tratamiento prometedor contra el cáncer se refleja en el aumento de reportes científicos sobre estudios de los mecanismos de muerte celular en células de cáncer provocado por la TFD, mediante el uso de FS de segunda generación y establecen que se necesitan más estudios para una mejor comprensión de cómo mueren las células cancerosas después de la TFD analizando el impacto en la respuesta inmune innata y adaptativa.²⁶

Con el análisis realizado a la literatura, descrito anteriormente, se puede decir que dentro del área de terapias contra el cáncer, la TFD es realmente una alternativa prometedora cuya investigación se debe seguir desarrollando para que en un futuro sea considerada como una opción de tratamiento en un paciente con cáncer.

Dentro de la TFD se estableció que los FS de segunda generación son más aptos para proporcionar una mejor terapia, de los cuales destacan las porfirinas. Asimismo, las referencias establecen que dentro de la síntesis de macrociclos aromáticos, las porfirinas no simétricas del tipo A₃B han presentado buenos resultados como agentes

anticancerígenos por lo cual son un campo de estudio prometedor y, aunado a esto, la bibliografía referente a este tipo de porfirinas es reducida.

CAPÍTULO 3.

En este capítulo se muestran los puntos principales en los cuales se fundamentó la realización del proyecto, se plantea la hipótesis, los objetivos y la aportación científica con la cual se puede contribuir al finalizar del proyecto.

3.1. HIPÓTESIS.

Nuevas tetraarilporfirinas del tipo A_3B con *p*-clorofenilo como sustituyente *meso* A o B, presentan mayor potencia como fotosensibilizadores en líneas celulares cancerígenas en comparación con la 5,10,15,20-Tetrakis (4-hidroxifenil)-21H, 23H- porfirina (THFP).

3.2. OBJETIVO GENERAL.

Realizar la síntesis y caracterización de nuevas tetraarilporfirinas no simétricas A_3B y la determinación de su actividad fotosensibilizadora *in vitro*.

3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

3.3.1. Sintetizar porfirinas no simétricas A_3B .

3.3.2. Realizar la purificación de los productos obtenidos.

- 3.3.3. Caracterizar los productos mediante espectrofotometría UV-Vis, Resonancia Magnética Nuclear de Protón y Espectrometría de Masas de Baja y Alta Resolución.
- 3.3.4. Realizar el estudio de la fotodegradación de las porfirinas sintetizadas.
- 3.3.5. Determinar la actividad anticancerígena y citotóxica de las nuevas porfirinas sintetizadas.

3.4. JUSTIFICACIÓN.

La síntesis de nuevas porfirinas del tipo A₃B y el estudio de su actividad anticancerígena *in vitro*, permitirá ofrecer nuevas opciones de fotosensibilizadores potenciales para el tratamiento del cáncer.

CAPÍTULO 4.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En este capítulo se presenta la metodología experimental llevada a cabo para lograr la obtención de cada una de las porfirinas sintetizadas, la técnica de purificación empleada, el proceso de caracterización llevado a cabo, el análisis de fotodegradación realizado a las porfirinas y la metodología del cultivo celular utilizado en las pruebas biológicas para evaluar la citotoxicidad, actividad anticancerígena y la obtención del índice apoptótico.

INFORMACIÓN GENERAL.

La parte de síntesis orgánica fue llevada a cabo en el Laboratorio de Química Industrial ubicado en el Centro de Laboratorios Especializados (CELAES) de la FCQ de la UANL.

Para la síntesis de porfirinas se utilizaron los siguientes reactivos:

- SIGMA-ALDRICH: 4-Clorobenzaldehído 97%, 4-Hidroxibenzaldehído 98%, benzaldehído 99%, Pirrol 98% (Destilado antes de cada reacción.),

Trifluoruro de boro eterato ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$), Ácido trifluoroacético 99% (TFA) y 2,3-dicloro-5,6-diciano-benzoquinona 98% (DDQ). Sílica gel 60, 0.040-0.063 (230-400 mesh).

- ALFA AESAR: 4-Metoxibenzaldehído 98 %. De J.T. BAKER: Ácido propiónico 99%
- CTR SCIENTIFIC: 2-Propanol.
- Desarrollo de Especialidades Químicas: Disolventes diclorometano, hexano y metanol (grado industrial) los cuales fueron destilados para su uso.

Para la caracterización de los productos mediante espectrofotometría UV-Vis, se utilizó el espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda 12 ubicado en el Laboratorio de Electroquímica en la Escuela de Graduados de la FCQ de la UANL y el espectrofotómetro UV-Vis ubicado en el Laboratorio de Biofarmacia del CELAES de la FCQ de la UANL.

Los análisis de Espectrometría de Masas de baja y alta resolución fueron realizados en el Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (Cuernavaca, Morelos). Utilizando el método de ionización FAB, con un espectrómetro de Masas de Alta Resolución MStation 700 JEOL.

La RMN ^1H fue realizada en la Universidad Autónoma del Estado de México (Toluca, Estado de México) con un equipo de 500 MHz Varian-NMR System.

La parte correspondiente a las pruebas biológicas fue realizada en el Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste del IMSS.

Los compuestos fueron evaluados en las líneas celulares utilizando los siguientes reactivos:

- PBS IX pH 7.4 (NaCl 138 mmol/L, K_2HPO_4 8.28 mmol/L, KH_2PO_4 1.76 mmol/L); medio de cultivo M199 GIBCO Invitrogen Corporation, suplementado con 5% Suero Fetal Bovino y 0.1% mezcla de antibióticos (200 000 UI Penilicina G-sódica, 0.5 g Sulfato de estreptomina); medio de cultivo MEM GIBCO Invitrogen Corporation, suplementado con 10% Suero Fetal Bovino y 0.1% mezcla de antibióticos (200 000 UI Penilicina G-sódica, 0.5 g Sulfato de estreptomina); tripsina al 0.25% BD Difco; reactivo de proliferación celular WST-1 Roche Diagnostics; kit de detección de apoptosis *In situ* TACS 2 TdT-DAB Trevigen.

Para los cultivos celulares se empleó una incubadora SANYO CO_2 Incubator Safe cell UV (MCO-19 AIC), centrifuga 5810R eppendorf, lector de placas BioTek Synergy HT MultiDetection Microplate Reader, lámpara de LEDs ATLED Apollo

BR40 35W *true white* (ángulo del haz 60°), frascos de cuello inclinado para cultivo celular 25 cm², Placas de 96 pozos fondo plano translúcidas y de paredes oscuras Corning.

Forma de manejo y disposición de los residuos generados.

Las reacciones que se llevaron a cabo no son consideradas de alto riesgo para la salud, por lo que para su realización se utilizó el equipo personal de seguridad en el laboratorio (bata, lentes y guantes) y las reacciones fueron realizadas en campana de extracción.

Para descartar los residuos generados, se siguió el programa de disposición de residuos implementado por la FCQ de la UANL, utilizando los siguientes contenedores:

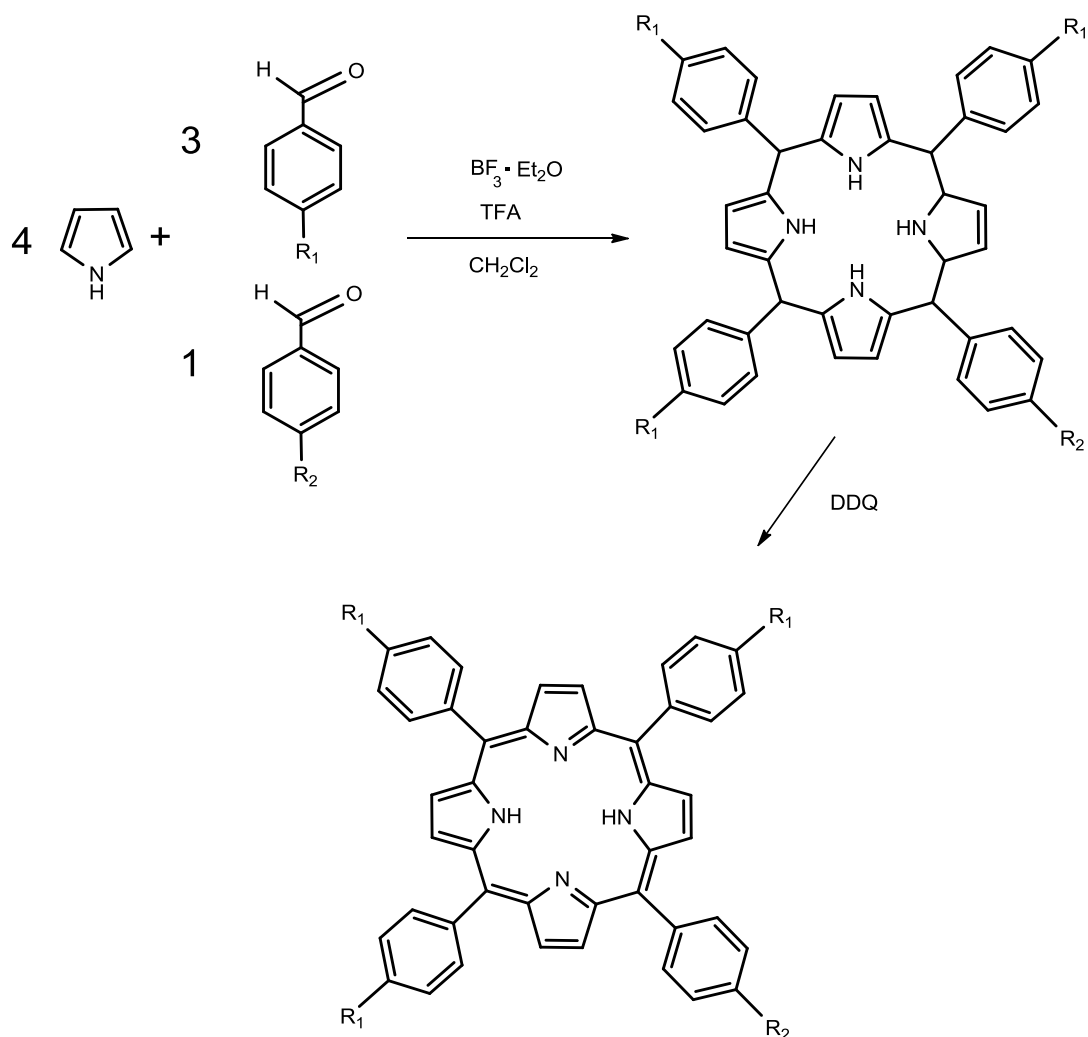
- **A:** soluciones de sales inorgánicas, ácidos y bases neutralizados.
- **B:** sólidos inorgánicos.
- **C:** compuestos y disolventes orgánicos no halogenados.
- **D:** compuestos y disolventes orgánicos halogenados.
- **E:** muy tóxico, cancerígeno orgánico.
- **G:** sólidos orgánicos.
- Vidrio impregnado de sustancias químicas.
- Plástico impregnado con sustancias químicas.
- Basura industrial.

- Residuos biológicos: el desecho de estos residuos se llevó a cabo mediante el estándar de clasificación de los RPBI (Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos) empleando:
 - i. Contenedor rojo: Residuos punzocortantes biológico-infeccioso
 - ii. Contenedor amarillo: Residuos patológicos (órganos, tejidos, células biológico-infecciosas).

4.1 SÍNTESIS DE PORFIRINAS NO SIMÉTRICAS (MÉTODO DE LINDSEY).

Se llevó a cabo la síntesis de las porfirinas no simétricas del tipo A₃B siguiendo el método descrito por Lindsey (Esquema 6, Tabla 7), en el cual se parte de pirrol (5mmol) y la mezcla de aldehídos deseada en proporción 1:1. Esta relación se cumple al emplear 3.5 mmol del aldehído A y 1.5 mmol del aldehído B (aldehídos en proporción 3:1), en diclorometano.

La reacción se realizó en presencia de BF₃.Et₂O (9.72x10⁻³ mmol) y TFA (4.57mmol), en atmósfera inerte (N₂) a temperatura ambiente por 2 h, para la obtención del intermediario porfirinógeno. Finalmente, se adicionó DDQ (0.251 mmol) para oxidar el porfirinógeno y obtener la porfirina deseada.³⁸



Esquema 6. Síntesis de porfirinas no simétricas tipo A₃B por el método de Lindsey.

Tabla 7. Porphirinas no simétricas tipo A₃B sintetizadas por el método de Lindsey.

Porfirina	Sustituyente	
	R ₁	R ₂
NS1E	Cl	OCH ₃
NS2E	Cl	H
NS3E	Cl	OH
NS4E	OCH ₃	Cl
NS5E	H	Cl
NS6E	OH	Cl

4.2 PURIFICACIÓN DE PORFIRINAS NO SIMÉTRICAS.

La purificación de los productos obtenidos se realizó empleando una columna cromatográfica con gel de sílice y una combinación de disolventes, los cuales fueron elegidos de acuerdo al comportamiento del producto obtenido, en base a la mejor separación de los compuestos de interés.

Se evaluaron diferentes sistemas mediante cromatografía en capa fina y se eligió el que presentó una eficiente separación.

4.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS.

La caracterización inicial se llevó a cabo por espectrofotometría UV-Vis. Una vez que se observó el patrón característico de las porfirinas (banda Soret a ~ 420 nm y cuatro bandas Q entre 480-700 nm), se continuó con los siguientes estudios.

El análisis por Espectrometría de Masas de baja resolución se llevó a cabo utilizando el método de ionización FAB, la información de interés en este estudio fue identificar la presencia del ión molecular correspondiente a la masa molecular del compuesto deseado en cada caso.

El estudio de Resonancia Magnética Nuclear de protón proporcionó información relevante con respecto a los Hidrógenos presentes en cada compuesto como: desplazamiento químico (δ ppm), multiplicidad (m), constantes de acoplamiento (J) y cantidad de protones de cada molécula.

El análisis de masas de alta resolución dio referencia del porcentaje de pureza obtenido para cada porfirina sintetizada y purificada.

Los resultados obtenidos después de los análisis llevados a cabo, se interpretaron y cotejaron buscando la relación de éstos con los resultados esperados para posteriormente confirmar o no, la presencia de cada uno de los compuestos de interés y su estructura correspondiente.

4.4 ANÁLISIS DE LA FOTODEGRADACIÓN DE LAS PORFIRINAS.

Se preparó una solución de 50 $\mu\text{g/mL}$, se tomaron 5 mL y se colocaron en viales de vidrio para evaluar a diferentes tiempos (0 h, 2 h y 4h), por triplicado.

Se probaron 3 sistemas por separado (Figura 11):

- Lámpara de halógeno-tungsteno (HAL-TU) a 25 cm de la muestra (Figura 11 a).
- Lámpara de LED de 10W a 15cm de la muestra (Figura 11 b).

- Lámpara de LED de 35W a 15cm de la muestra (Figura 11 c).

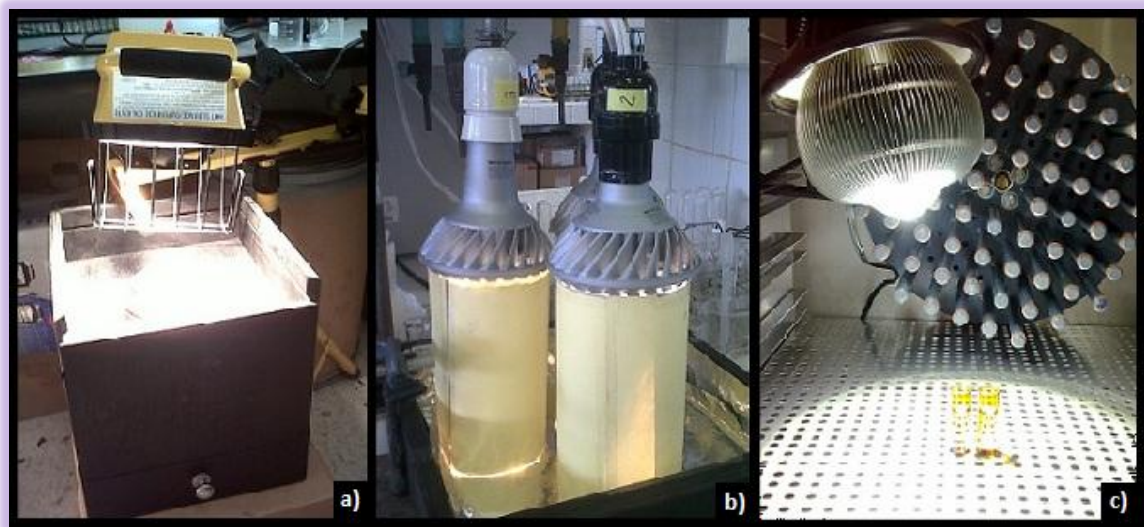


Figura 11. Fotodegradación de las porfirinas.

a) Lámpara halógeno-tungsteno 500W, b) lámparas LED 10W c) lámpara LED 35W.

Las tres muestras de cada compuesto se irradiaron por 2 y 4 h, posteriormente se obtuvieron sus espectros de UV-Vis.

4.5 PRUEBAS BIOLÓGICAS EN LÍNEAS CELULARES.

Se seleccionaron las líneas celulares: HeLa (células epiteliales de adenocarcinoma de cérvix humano) y MCF7 (células epiteliales de adenocarcinoma de mama humano) para ser empleadas en los ensayos de citotoxicidad y efecto anticancerígeno *in vitro* (Figura 12).

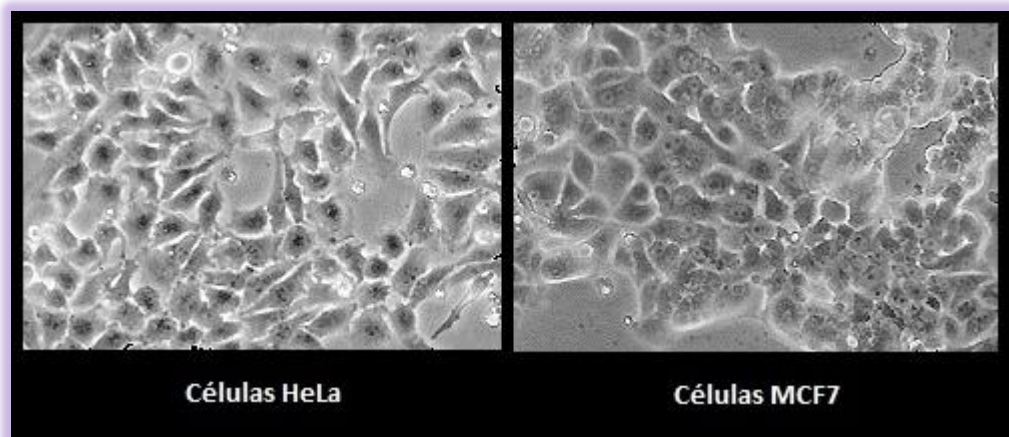


Figura 12. Morfología de las líneas celulares utilizadas.

La evaluación de la citotoxicidad intrínseca de las porfirinas se llevó a cabo en líneas celulares HeLa y MCF7, por cuadruplicado evaluando diferentes concentraciones de las porfirinas sintetizadas y el control THFP.

La evaluación de la actividad anticancerígena se realizó en las líneas celulares HeLa y MCF7, por cuadruplicado evaluando diferentes concentraciones de las porfirinas sintetizadas y el control THFP, todos con 2 h de irradiación.

Todo el proceso relacionado con las pruebas biológicas fue realizado en un ambiente de esterilidad.

4.5.1 Propagación celular.

Para la realización de los ensayos fue necesario propagar las dos líneas celulares con la finalidad de partir de un cultivo celular viable, activo y que se encontrara en fase exponencial. Por lo cual se partió de un cultivo confluyente que se utilizó para propagar las células y así contar con el número suficiente de estas para la realización de los ensayos.

El cultivo fuente fue tratado con 0.5 mL de tripsina 0.25%, se incubó por 10 min a 37°C para despegar la monocapa celular, se adicionó 2 mL de medio de cultivo para inactivar la enzima y de esta suspensión celular se tomaron alícuotas para sembrar en más frascos de cultivo, finalmente se agregó medio de cultivo hasta alcanzar un volumen final 4 mL de solución y se incubó hasta observar un cultivo confluyente a 37°C en un ambiente con 5% de CO₂ y humedad.

4.5.2 Determinación de la viabilidad celular por la técnica WST-1 para evaluar la actividad citotóxica de las porfirinas.

Un cultivo celular viable y confluyente (de células HeLa y MCF7), fue disociado con tripsina al 0.25%, se incubó 10 min a 37°C para que pudiera actuar la enzima, posteriormente se inactivó con 2 mL de medio de cultivo MEM. La suspensión celular se tomó y se colocó en

un tubo cónico, se centrifugó y la pastilla celular o pellet se resuspendió en medio de cultivo para realizar el conteo celular en cámara de Neubauer. Una vez conocida la concentración celular/mL, se realizaron los cálculos para colocar 7000 células/pozo en 100 μL ; en una placa de reacción de 96 pozos de paredes oscuras, se incubó 24 h a 37°C en atmósfera húmeda y con 5% de CO_2 .

Posteriormente se prepararon las diferentes concentraciones de los compuestos a evaluar, partiendo de una solución stock de 1 mg/mL de porfirina en acetona (esterilizada por filtración). Las concentraciones probadas se muestran en la Tabla 8:

Tabla 8. Concentraciones probadas de los compuestos sintetizados.

Concentración	
Por pozo (ng/ 200 μL)	Final ($\mu\text{g}/ \text{mL}$)
10 000	100
5 000	50
1 000	10
100	1
10	0.1

De la solución stock se tomaron 200 μL y se agregaron 800 μL de medio de cultivo (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$); de la solución anterior se tomaron 100 μL y se adicionaron 900 μL de medio de cultivo (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$); de la solución anterior se tomaron 100 μL y se adicionaron 900 μL de

medio de cultivo ($2 \mu\text{g/mL}$); de la solución anterior se tomaron $100 \mu\text{L}$ y se adicionaron $900 \mu\text{L}$ de medio de cultivo ($0.2 \mu\text{g/mL}$). Para la preparación de la solución de $100 \mu\text{g/mL}$ se tomaron $100 \mu\text{L}$ del stock de 1 mg/mL y se adicionaron $900 \mu\text{L}$ de medio de cultivo. La distribución de los compuestos y controles evaluados se muestra en la Figura 13 y Figura 14 respectivamente.

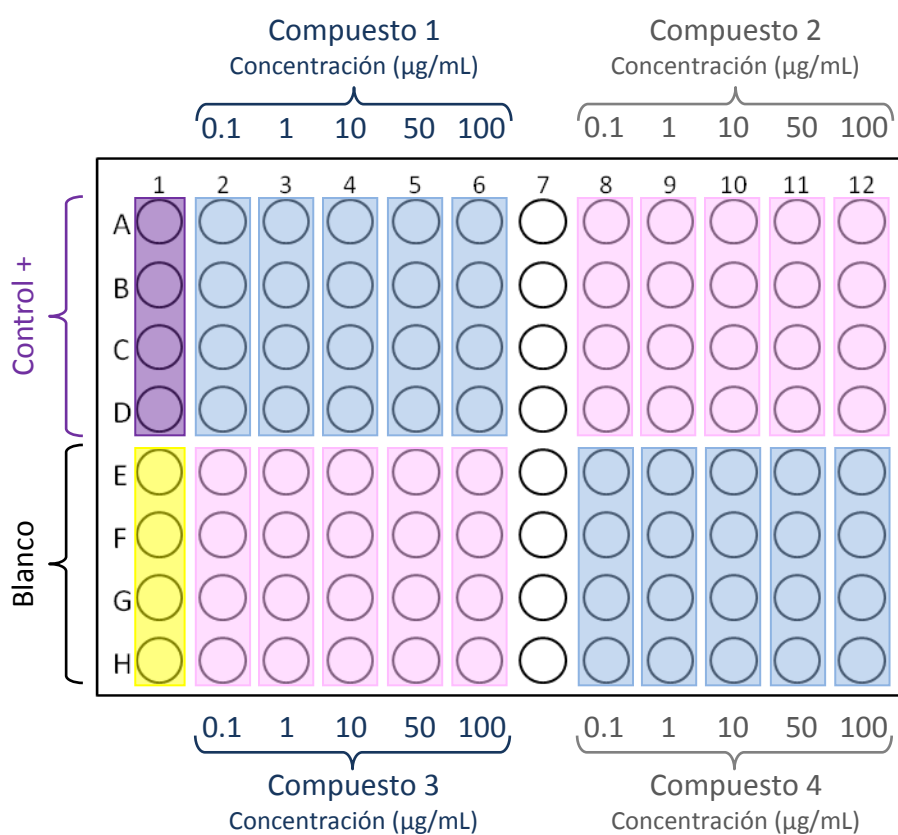


Figura 13. Distribución de los compuestos en la placa de 96 pozos.

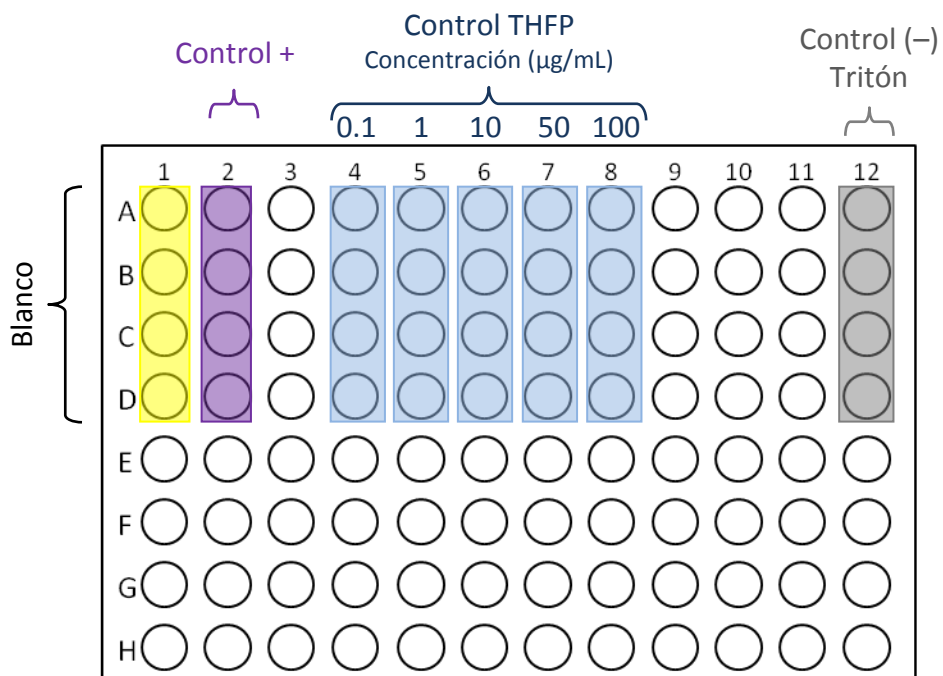


Figura 14. Distribución de los controles en la placa de 96 pozos.

Una vez adicionados los compuestos y los controles, se incubaron las placas de 96 pozos por 48 h a 37°C con 5% CO₂ y ambiente de humedad.

El medio de cultivo con los compuestos adicionados fue reemplazado después de las 48 h de incubación, por 200 µL medio de cultivo y se agregaron 10 µL de reactivo WST-1 y se incubó a 37°C, 1.5 h para las células HeLa y 2 h para las células MCF-7. Se realizaron dos lecturas de la placa de 96 pozos en el lector de ELISA a una longitud de onda de 450 nm, utilizando el software Gen5.

4.5.3 Determinación de la viabilidad celular por la técnica WST-1 para evaluar la actividad anticancerígena de las porfirinas.

La determinación de la actividad anticancerígena de las porfirinas, fue realizada en dos líneas celulares cancerígenas: HeLa y MCF7.

Un cultivo celular viable y confluyente de fue dissociado con tripsina al 0.25%, se incubó 10 min a 37°C para que pudiera actuar la enzima, posteriormente se inactivó con 2 mL de medio de cultivo MEM. La suspensión celular se tomó y se colocó en un tubo cónico, se centrifugó y la pastilla celular o pellet se resuspendió en medio de cultivo para realizar el conteo celular en cámara de Neubauer. Una vez conocida la concentración celular/mL, se realizaron los cálculos para colocar 7000 células/pozo en 100 μ L; en una placa de reacción de 96 pozos de paredes oscuras, se incubó 24 h a 37°C en atmósfera húmeda y con 5% de CO₂.

Posteriormente se prepararon las diferentes concentraciones de los compuestos a evaluar, partiendo de una solución stock de 1 mg/mL de porfirina en acetona (esterilizada por filtración). Las concentraciones probadas fueron las mismas que las mostradas en la Tabla 8.

Las diferentes concentraciones a evaluar, fueron preparadas de igual manera que en la evaluación de la actividad citotóxica empleando medio de cultivo MEM.

La distribución de los compuestos y controles evaluados fue la misma que la que se mostró en la Figura 13 y Figura 14.

Una vez adicionados los compuestos y los controles, se incubaron las placas de 96 pozos por 24 h a 37°C con 5% CO₂ y ambiente de humedad.

El medio de cultivo con los compuestos adicionados fue remplazado después de las 24 h de incubación, por 100 µL de solución salina balanceada de Hank (SSBH) y la placa de reacción se irradió por 2 h a 37°C (Figura 15) utilizando la lámpara ALTLED 35W. Después de este tiempo, la SSBH se retiró y se adicionó medio de cultivo MEM (200 µL) y se incubó por 24 h a 37°C con 5% de CO₂ y en atmósfera húmeda.



Figura 15. Imagen del proceso de irradiación.

El reactivo WST-1 fue adicionado una vez concluido el tiempo de incubación, 10 μL a cada pozo. Y se incubó a 37°C 1.5 h para las células HeLa y 2 h para las células MCF-7. Después del tiempo de incubación se realizaron dos lecturas de la placa de 96 pozos en el lector de ELISA a una longitud de onda de 450 nm, utilizando el software Gen5.

4.5.4 Determinación de apoptosis por la técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling).

Para la determinación de apoptosis se utilizó la técnica de TUNEL, se eligieron las dos porfirinas más activas y se procedió a realizar la técnica utilizando una laminilla estéril con 8 compartimentos y cubierta. En esta se sembraron 30 000 cel/pozo en 200 μ L de medio de cultivo y se incubó 24 h a 37° C con 5% CO₂ y humedad.

Los compuestos fueron adicionados empleando la IC50 de cada uno en 100 μ L, a los controles positivo y negativo de apoptosis se agregaron medio de cultivo. Una vez adicionados los compuestos, la laminilla se incubó a 37°C por 24 h con 5% de CO₂ y ambiente húmedo. El proceso de irradiación se realizó pasadas las 24 h de contacto con los compuestos y después de 2 h de incidir la luz, se volvió a incubar por 3 h más. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se hizo un lavado con PBS IX.

Para la realización del marcaje celular se siguió la metodología descrita en el kit. Las células fueron fijadas por 10 min con 200 μ L de buffer formaldehído 3.7% (en PBS), se hizo un lavado con 200 μ L PBS IX, se retiró la parte de los compartimentos de la laminilla y se colocó en una caja Coplin con PBS IX por 10 min. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 30 min con 50 μ L de una solución de proteinasa K, se realizaron dos

lavados de 2 min cada uno en agua desionizada y la laminilla fue sumergida en solución bloqueadora (10% H₂O₂ en metanol) por 5 min.

Se realizó un lavado de 1 min en PBS IX, después de esto se sumergió en Buffer de marcaje IX (1 M TACS® Safe-TdT Buffer, 0.5 mg/ml BSA (Albúmina de suero de bovino) 0.6 mM ácido 2-mercaptoetanosulfónico) por 5 min, se cubrió la muestra con 50 µL de la mezcla de reacción de marcaje (0.25 mM dNTP biotinilados, enzima TdT, Magnesio, Buffer de marcaje IX) y se incubó en cámara de humedad 1 h a 37 °C. Al control positivo de apoptosis se adicionó la mezcla de reacción 1 µL más de TACS nucleasa. La laminilla fue sumergida en Buffer TdT Stop IX (0.1 M EDTA) por 5 min y lavada dos veces con agua desionizada por 5 min en cada lavado. Se adicionaron 50 µL de la solución Strep-HRP (estreptavidina- peroxidasa de rábano), se incubó 10 min a 37°C y se lavó dos veces en PBS IX por 2 min cada uno.

Una vez concluidos los lavados, se sumergió la laminilla en solución DAB (diaminobencidina, PBS IX, H₂O₂) por 3 min y se realizaron 3 lavados en agua desionizada por 2 min cada uno. Para la contratinción se adicionaron 100 µL del colorante verde de metilo a cada laminilla y se dejó 2 min.

Finalmente se lavaron las muestras sumergiéndolas subsecuentemente 10 veces en: agua desionizada (2 cambios), etanol 70% (2 cambios), etanol

95% (2 cambios), etanol 100% (2 cambios), xilol (2 cambios). Se retiró el exceso de xilol, se realizó la preparación permanente con resina y se observó al microscopio.

CAPÍTULO 5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos tanto del área de síntesis, purificación y caracterización de las porfirinas, como también de las pruebas biológicas realizadas a las mismas.

A. SÍNTESIS ORGÁNICA.

5.1. PORFIRINA NO SIMÉTRICA NS1E.

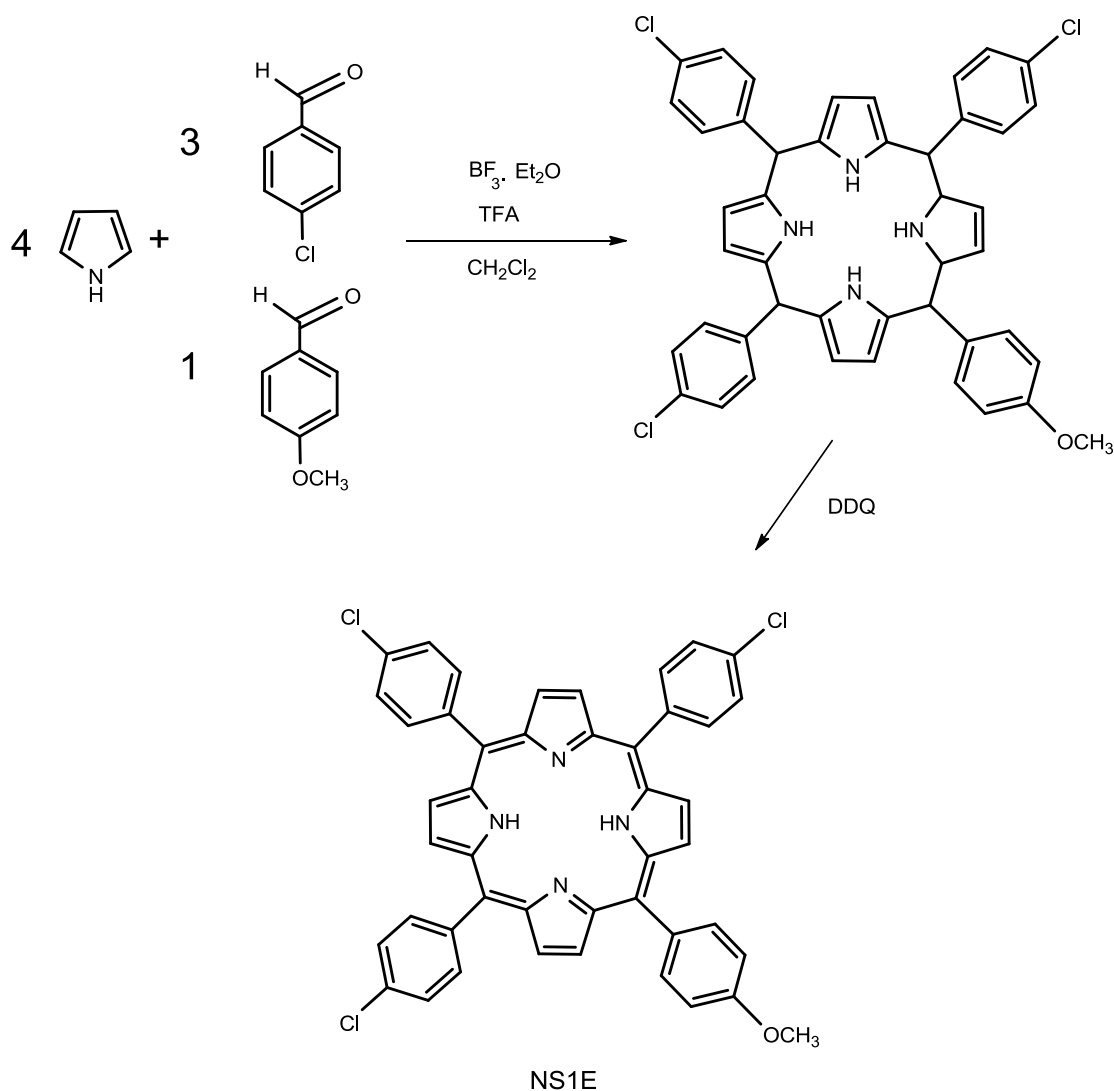
5.1.1. SÍNTESIS DE NS1E.

La síntesis de la porfirina no simétrica A₃B (A: *p*-clorofenilo, B: *p*-metoxifenilo) (NS1E) se llevó a cabo por el método de Lindsey empleando los siguientes reactivos (Tabla 9):

Tabla 9. Reactivos empleados para la síntesis de la porfirina NS1E.

REACTIVO	n (mmol)	CANTIDAD
Pirrol	5	0.35 mL
<i>p</i> -Clorobenzaldehído	3.75	0.5267 g
<i>p</i> -Metoxibenzaldehído	1.25	0.15 mL
Solución de BF ₃ ·Et ₂ O	9.7×10 ⁻²	1.2 mL
TFA	4.57	0.35 mL
DDQ	0.251	0.570 g

La mezcla de reacción mostró inicialmente una coloración naranja oscuro que cambió a color vino luego de las dos horas correspondientes al primer paso de reacción. Una vez adicionado el DDQ, se observó un cambio de coloración a verde oscuro, terminando la reacción después de dos horas más de agitación.



Esquema 7. Ruta sintética de la porfirina NS1E. Método de Lindsey.

5.1.2. PURIFICACIÓN DE NS1E.

El crudo de reacción obtenido después de las cuatro horas de reacción fue rotaevaporado y sometido a una primera purificación por medio de cromatografía en columna. Para esta primera purificación se empleó el sistema diclorometano-hexano 7:3 y se obtuvieron 150 fracciones con este sistema, las fracciones posteriores empezaron a salir muy diluidas (rosa pálido) por lo cual se incrementó la polaridad a diclorometano-isopropanol 99:1, se continuó obteniendo fracciones de color violeta oscuro; se juntó con las fracciones anteriores debido a que no se obtuvo una eficiente separación ya que únicamente se deseaba eliminar el DDQ que se observa como un producto sólido de color negro.

Para la siguiente purificación, se llevaron a cabo varias pruebas con diferentes sistemas buscando conseguir la mejor separación de las porfirinas obtenidas en la reacción. Los sistemas probados fueron: diclorometano-hexano 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, de los cuales la mejor separación se consiguió con diclorometano-hexano 7:3, sin embargo el producto no era del todo soluble en el sistema. Por lo anterior, se optó por emplear el sistema diclorometano-hexano 7:3 tomando únicamente el producto que se solubilizó en el sistema, éste fue adsorbido en gel de sílice y se adicionó a la columna para su purificación.

La columna que se utilizó para llevar a cabo la purificación, fue una columna de vidrio de 1.2 cm de diámetro a la cual se empacó con gel de sílice a una altura promedio de 45 cm. Dado que la manera en que se lograba una eficiente separación fue únicamente con el proceso descrito anteriormente, se tuvieron que realizar 20 columnas agregando solamente el producto solubilizado.

La purificación se monitoreó por cromatografía en capa fina (CCF) (Figura 16) utilizando como referencia las porfirinas simétricas S1E y S2E (ver anexo 1).

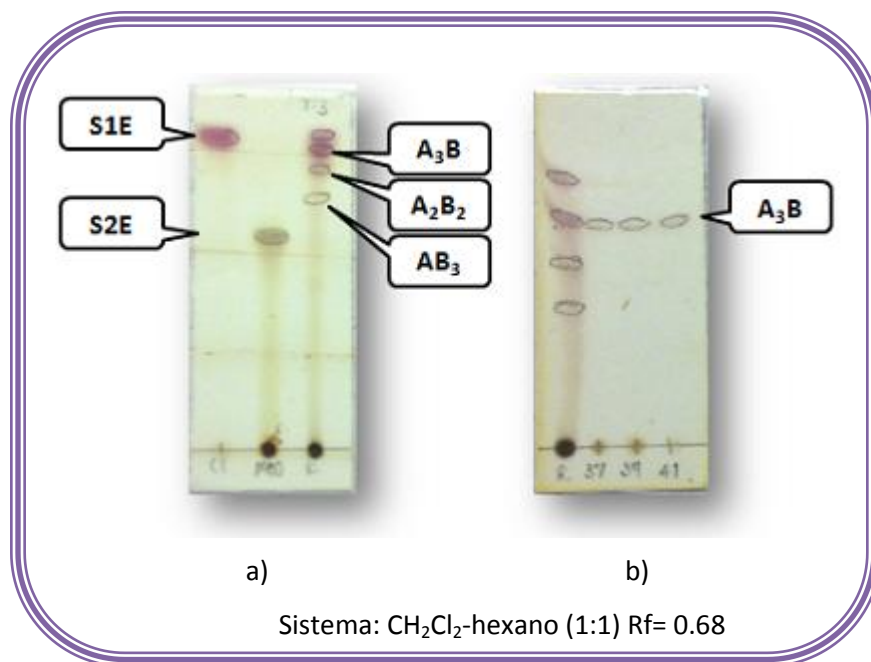


Figura 16. Cromatografía en capa fina de NS1E
a) Comparación de las diferentes porfirinas obtenidas, b) fracciones colectadas con la porfirina A₃B pura.

Teniendo como base cada mancha de las porfirinas A₄, se relacionaron los subproductos en base a su polaridad y se asignaron los diferentes tipos de porfirinas obtenidas en la reacción. Se identificó la mancha de la porfirina A₃B como la segunda observada en la CCF y se juntaron las fracciones con el mismo factor de retención (Rf) en este caso Rf= 0.68; posteriormente, se eliminó el solvente y se observó el producto de la A₃B como un sólido de color morado, cuyo peso final fue de 50.7 mg.

5.1.3. RENDIMIENTO DE NS1E.

La porfirina no simétrica NS1E posee una masa molecular de 748.1 g/mol y después de realizar su purificación, se obtuvieron 50.7 mg, lo cual corresponde a un 5.4% de rendimiento. Cabe señalar que, el rendimiento obtenido se vio mermado en parte por el número de columnas que se realizaron y por las pruebas que se efectuaron antes de la purificación por columna cromatográfica.

5.1.4. CARACTERIZACIÓN DE NS1E.

5.1.4.1. ESPECTRO UV-VIS.

Se realizó la lectura de una solución de porfirina (0.5 mg/mL) en diclorometano utilizando el espectrofotómetro Ultravioleta-Visible y, como se observa en la Figura 17, se logró obtener el patrón característico de las porfirinas. El máximo de la banda Soret se observó en 413 nm mientras que las cuatro bandas Q aparecen en 515, 551, 591 y 647 nm.

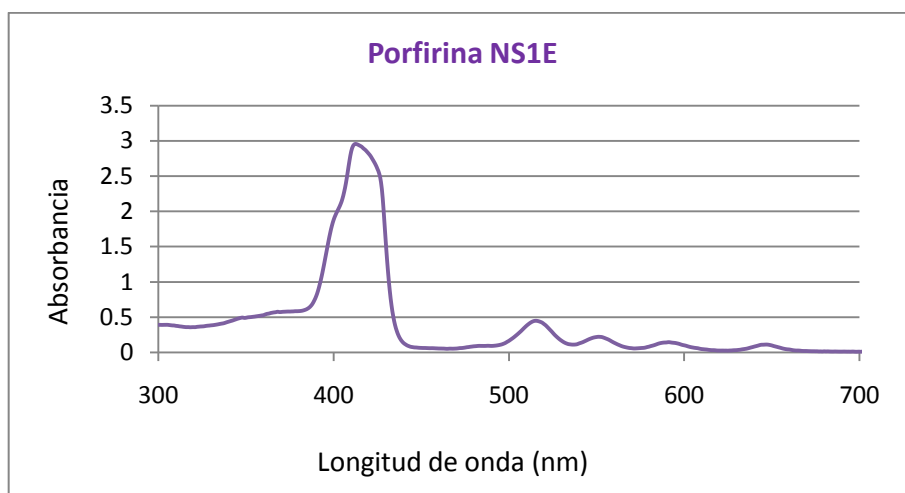


Figura 17. Espectro UV-Vis de la porfirina NS1E.

5.1.4.2. ESPECTRO RMN ^1H .

En el espectro de RMN ^1H (Figura 18) se observan las señales correspondientes a la porfirina NS1E. En δ -2.82 ppm, un singulete (s) que integra para 2 H y que corresponde a los protones unidos al N del macrociclo aromático (*a*). A un desplazamiento químico de 4.09 ppm (*b*) se observa otro singulete que integra para 3 protones y que son atribuidos al metoxilo unido al fenilo.

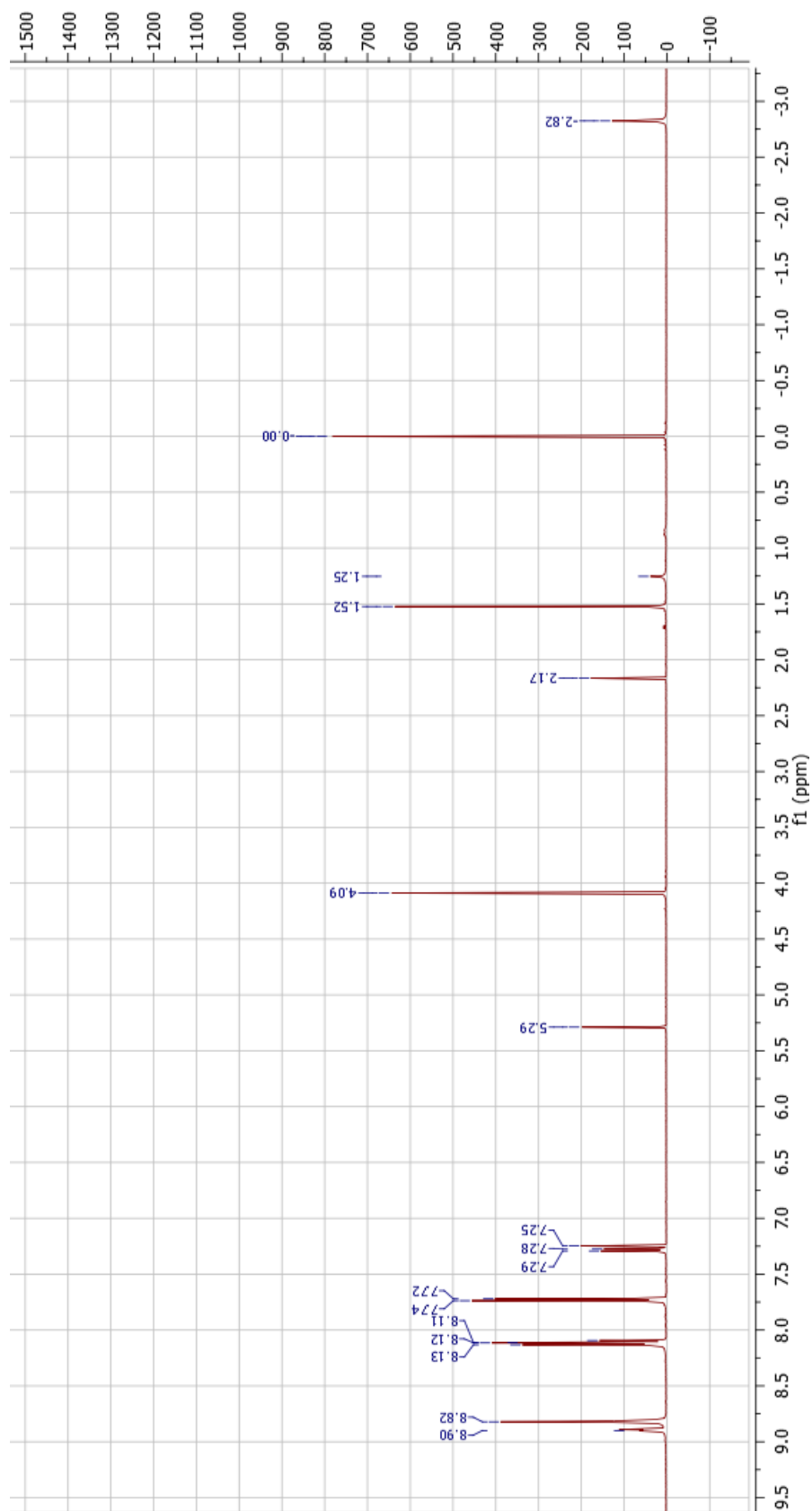


Figura 18. Espectro de RMN ^1H (400 Hz, CDCl_3) de NS1E.

En la ampliación del espectro del compuesto NS1E (Figura 19), se muestran con mayor claridad las señales de los protones restantes. Es importante señalar que las disposiciones *orto*-, *meta*- y *para* de los protones asignados, se describen con respecto al macrociclo base de la porfirina tanto para éste como para el resto de los compuestos sintetizados.

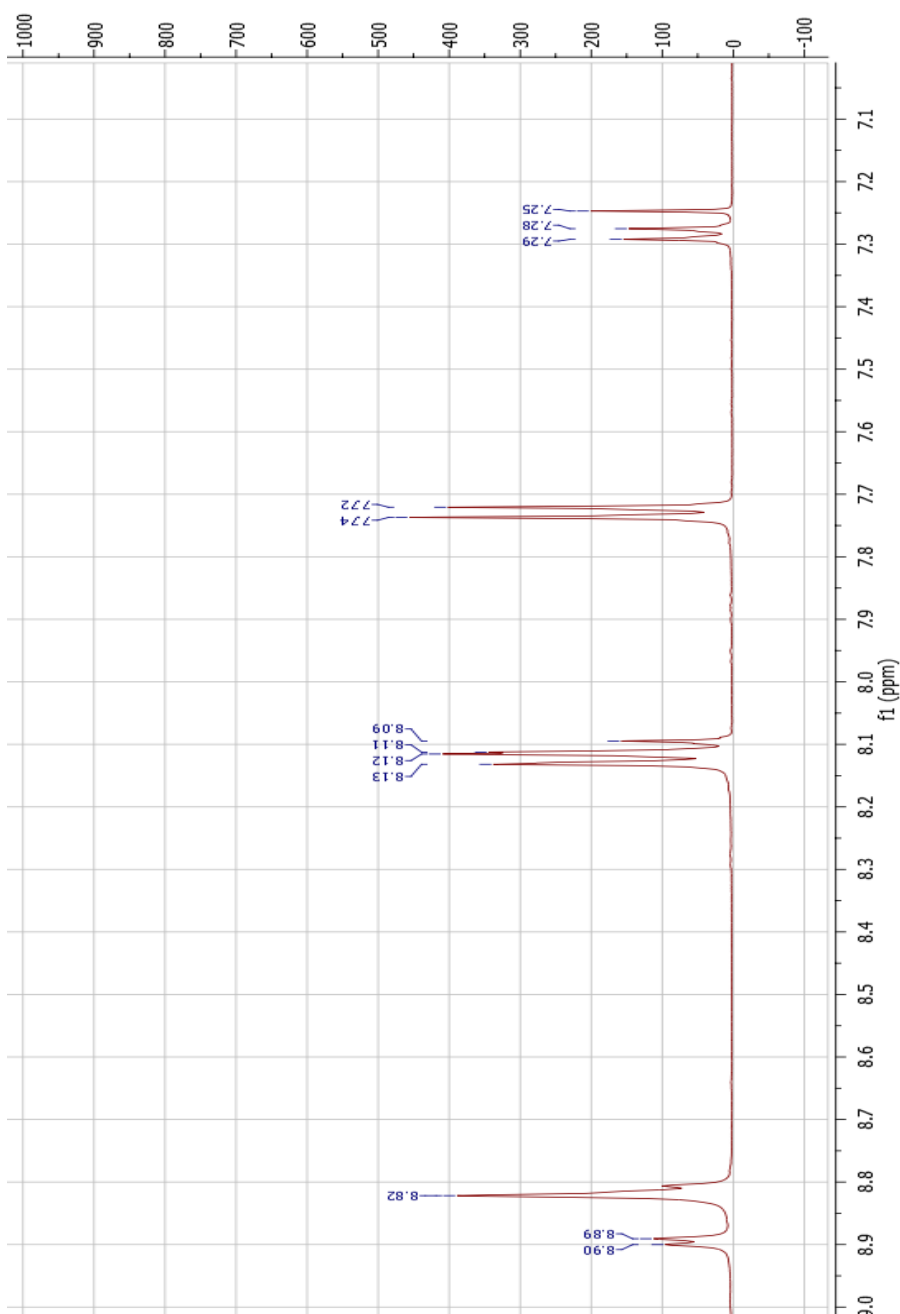


Figura 19. Ampliación del espectro de RMN ^1H de la porfirina NS1E.

En 7.28 ppm (*c*) se observa un doblete (*d*) ($J = 8.5$) que integra para 2 H y corresponde a los protones *meta* del *p*-metoxifenilo. A un desplazamiento químico de 7.73 ppm (*d*) se encuentra un doblete ($J = 8.2$) que integra para los 6 protones que se encuentran en posición *meta* del *p*-clorofenilo.

En 8.10 ppm (*e*) un doblete ($J = 8.9$) que integra para 2 H, asignado a los protones *orto* del *p*-metoxifenilo; enseguida de esta señal y un poco empalmada se observa otro doblete en 8.12 ppm (*f*) ($J = 8.2$) que integra para los 6 H *orto* del *p*-clorofenilo. En 8.81 ppm (*g*) se observa un doblete ($J = 4.5$) que integra para 2 H, esta señal corresponde a los protones β del pirrol cercanos al *p*-metoxifenilo; inmediatamente después a un desplazamiento químico de 8.82 ppm (*h*) se observa un singulete que integra para los 4 H de las 2 unidades de pirrol que están entre los 3 sustituyentes *meso p*-clorofenilo.

Finalmente, en 8.90 ppm (*i*) se encuentra un doblete ($J = 4.7$) que integra para los 2 H β del pirrol cercano al *p*-clorofenilo. En la siguiente imagen (Figura 20) se marcan los protones especificados anteriormente en letras *minúsculas* y entre paréntesis, para explicar claramente a qué protón se asignó cada señal.

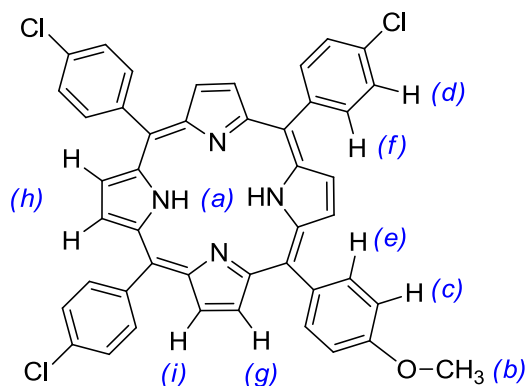


Figura 20. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H de la porfirina NS1E.

5.1.4.3. ESPECTRO MASAS.

Después de haber realizado el análisis de espectrometría de masas de baja resolución por ionización FAB, se obtuvo el espectro de fragmentación (Figura 21), cuyo objetivo era mostrar el ion molecular y de esta manera, al tener la relación masa/carga (m/z) poder comparar con la masa molecular de la porfirina NS1E (748.09 g/mol). En el espectro se logró observar el ión molecular M^+ con una relación de 748, lo cual indica que sí corresponde a la porfirina NS1E.

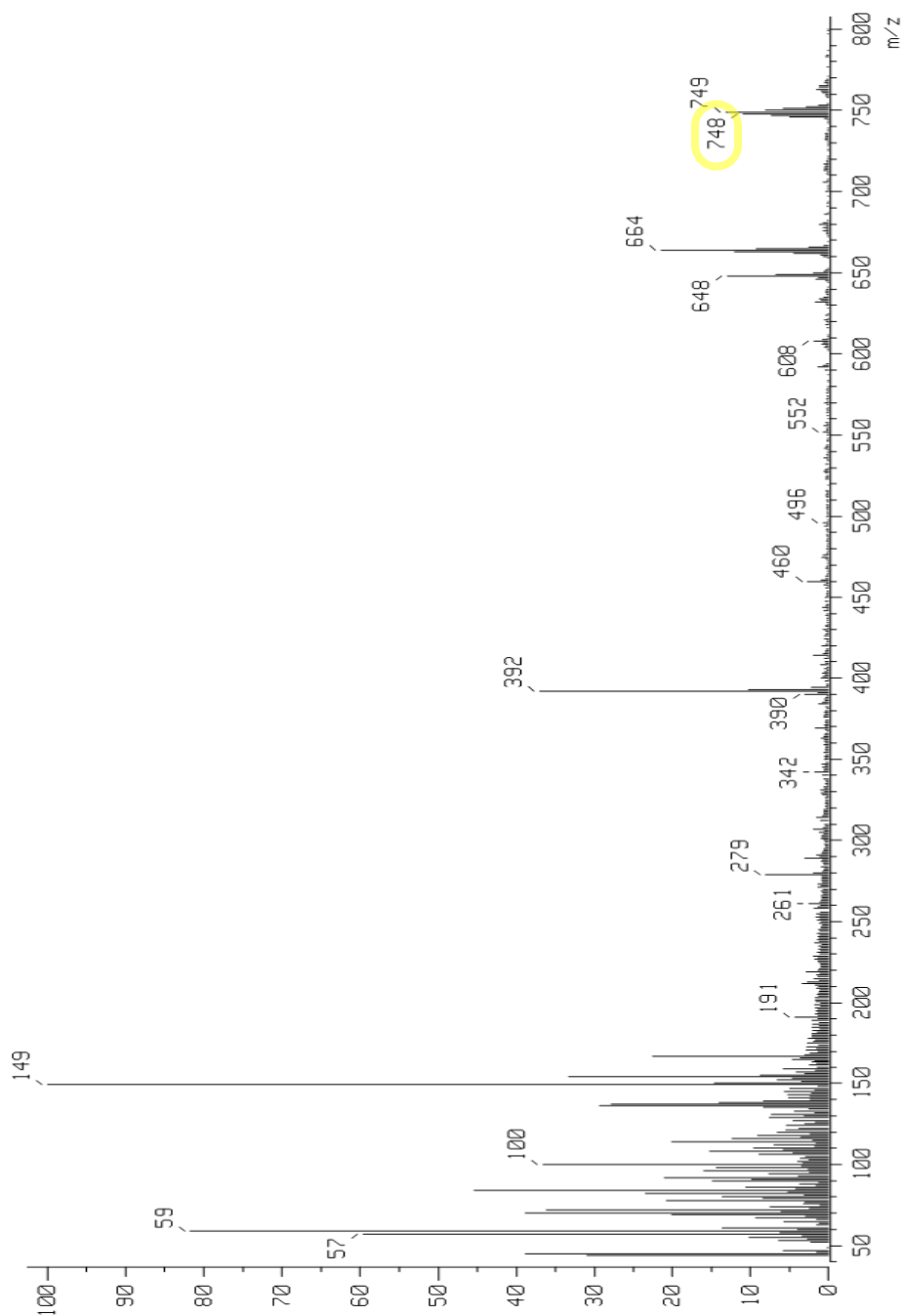


Figura 21. Espectro de masas (FAB) de la porfirina NS1E.

5.1.4.4. MASAS ALTA RESOLUCIÓN.

El análisis de Masas de alta resolución mostró una relación masa/carga (m/z) de 748.1602 y un porcentaje de pureza de 99.7%

Los datos analíticos de la porfirina no simétrica NS1E se muestran en la sección de anexos.

5.2. PORFIRINA NO SIMÉTRICA NS2E.

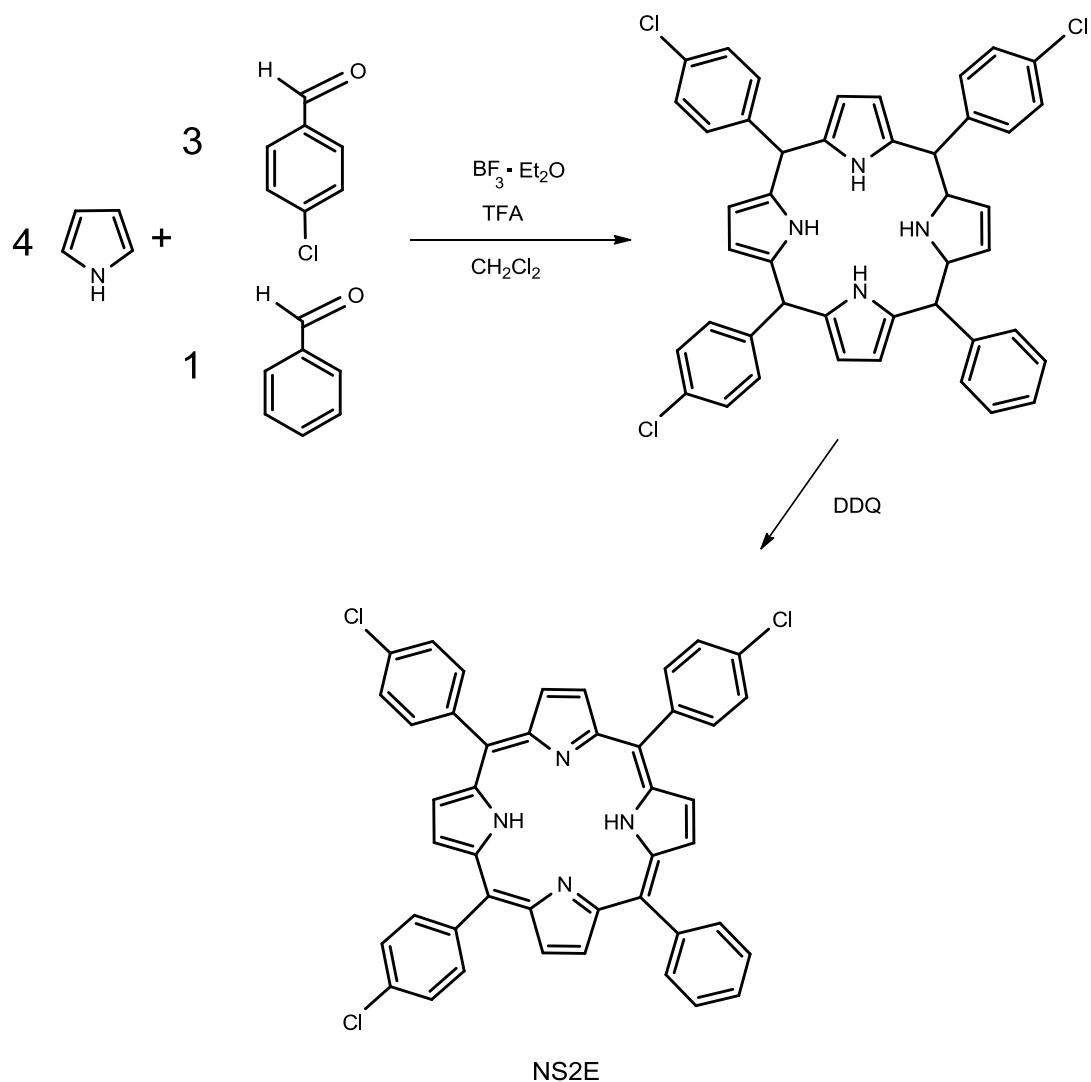
5.2.1. SÍNTESIS DE NS2E.

La síntesis de la porfirina no simétrica A₃B (A: *p*-clorofenilo, B: fenilo) (NS2E) se realizó siguiendo el método descrito por Lindsey, empleando los reactivos que se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Reactivos empleados para la síntesis de la porfirina NS2E

REACTIVO	n (mmol)	CANTIDAD
Pirrol	5	0.35 mL
<i>p</i> -Clorobenzaldehído	3.75	0.5267 g
Benzaldehído	1.25	0.13 mL
Solución de BF ₃ ·Et ₂ O	9.7x10 ⁻²	1.2 mL
TFA	4.57	0.35 mL
DDQ	0.251	0.570 g

Al inicio de la reacción, la coloración era naranja oscuro - rojizo y cambió a color vino. Posterior a las 2 h de reacción, se adicionó el DDQ y la coloración cambió a un verde oscuro, la reacción continuó en agitación por 2 horas más.



Esquema 8. Ruta sintética de la porfirina NS2E. Método de Lindsey.

5.2.2. PURIFICACIÓN DE NS2E.

La primera purificación por cromatografía en columna se realizó utilizando el sistema diclorometano-hexano (8:2) y una vez que empezó a salir la solución color rosa mexicano se colectaron 200 mL, después dejó de salir el producto por lo cual se incrementó la polaridad a diclorometano-isopropanol 99:1 y

continuó bajando una solución violeta intenso, de la cual se colectaron aproximadamente 500 mL.

Posteriormente, empezó a salir la solución color verde oscuro, al realizar el seguimiento por cromatografía en capa fina, se observaron las 4 manchas correspondientes a las porfirinas sintetizadas. Se colectaron aproximadamente 300 mL más, se realizó CCF y ya no se observaron las manchas de interés. Cabe destacar que con esta purificación únicamente se deseaba eliminar el DDQ (color negro). La columna cromatográfica utilizada fue de 3.5 cm de diámetro, la cual se empacó con gel de sílice hasta una altura de 20 cm.

Una vez eliminado el subproducto anterior, se realizaron pruebas para conseguir una separación eficaz de las porfirinas que se obtuvieron como producto en la reacción. Los sistemas probados fueron: diclorometano-hexano 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 1:3 y 1:4, de los cuales la mejor separación se consiguió con diclorometano-hexano 1:4; sin embargo, el producto no era del todo soluble en el sistema. Debido a la baja polaridad, la poca solubilidad de la muestra en el sistema y la cercanía de los productos al realizar la cromatografía en capa fina, la purificación de esta porfirina en particular representó una dificultad considerable. Por la situación descrita anteriormente, se optó por emplear el sistema hexano-diclorometano 4:1, se tomó con una pipeta Pasteur únicamente el producto que se solubilizó en el

sistema, se adsorbió en gel de sílice y se adicionó a la columna para su purificación.

Se requirió de una columna de gran altura, debido a que la separación entre los productos era muy pequeña. Se utilizó una columna de vidrio de 2 cm de diámetro empacada con gel de sílice a una altura promedio de 75 cm. Dado que el proceso descrito anteriormente resultó ser la única manera que resultaba en una eficiente separación, se tuvieron que llevar a cabo 18 columnas siguiendo el protocolo de adición de la muestra soluble en el sistema.

Las fracciones obtenidas presentaban una coloración rosa mexicano, se realizó CCF (Figura 22) y se mezclaron las que presentaron el mismo factor de retención ($R_f=0.33$). Se concentraron mediante rotaevaporación y se observó el producto como un sólido de color morado, cuyo peso final fue de 77.8 mg.

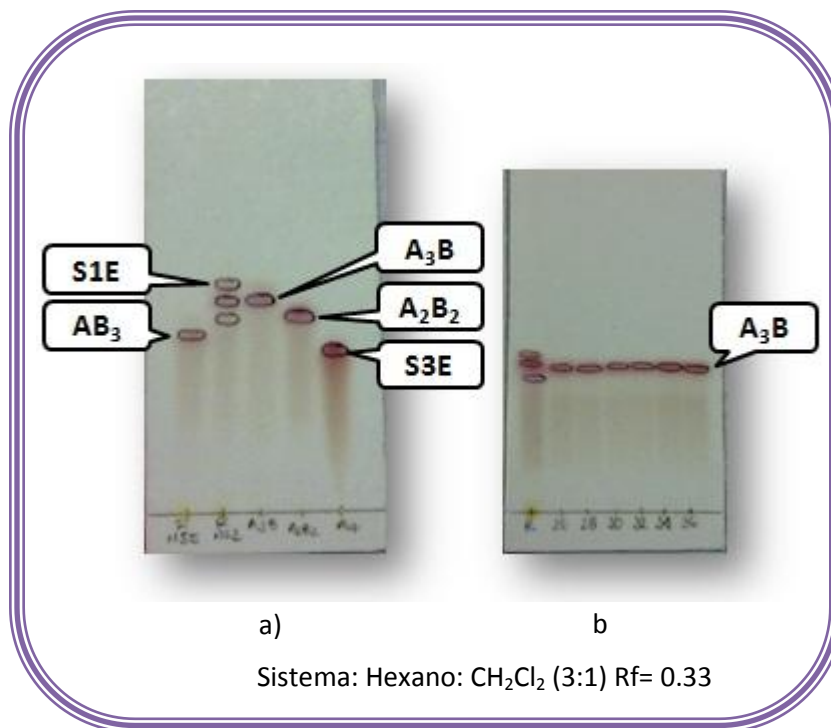


Figura 22. Cromatografía en capa fina de NS2E
a) Comparación de las diferentes porfirinas obtenidas, b) Fracciones colectadas con la porfirina A₃B pura.

5.2.3. RENDIMIENTO DE NS2E.

La masa molecular de la porfirina no simétrica NS2E es de 718.07 g/mol. Después de realizar la purificación de NS2E, se obtuvieron 77.8 mg que corresponden a un 8.67% de rendimiento. Como dato adicional, el rendimiento se vio afectado por el número de columnas que se tuvieron que realizar y por las pruebas llevadas a cabo para conseguir una buena purificación.

5.2.4. CARACTERIZACIÓN DE NS2E.

5.2.4.1. ESPECTRO UV-VIS.

Se preparó una solución de porfirina (0.5 mg/mL en diclorometano) para poder determinar cualitativamente si el compuesto obtenido mostraba el patrón característico de las porfirinas. Se realizó la lectura en el espectrofotómetro Ultravioleta Visible, y como muestra la Figura 23, se obtuvo el patrón característico de las porfirinas. El máximo de la banda Soret se observó en 412 nm mientras que las cuatro bandas Q aparecen en 514, 549, 588 y 645 nm.

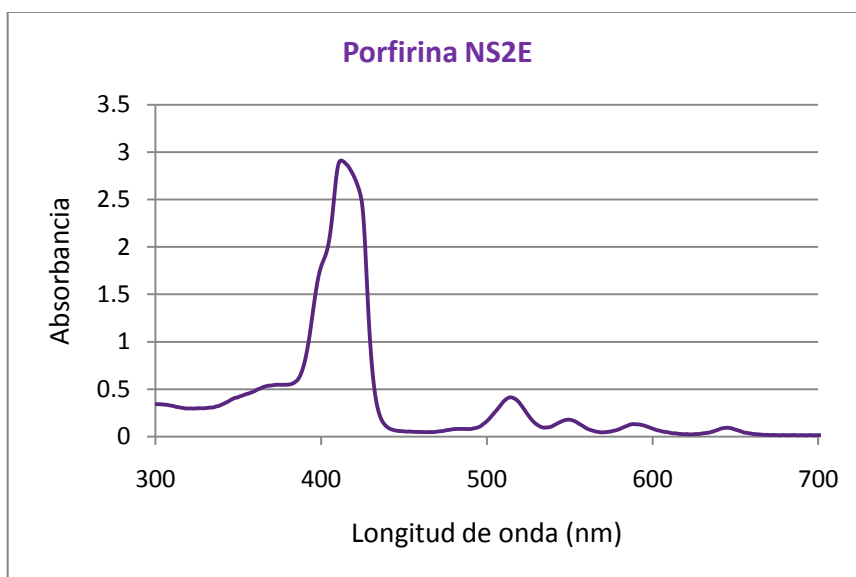


Figura 23. Espectro de UV-Vis de la porfirina NS2E.

5.2.4.2. ESPECTRO RMN ^1H .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^1H se muestra en la Figura 24. A un desplazamiento químico de -2.83 ppm (α) se observa una señal singulete que integra para 2 H y que corresponde a los 2 protones del N-H del macrociclo aromático.

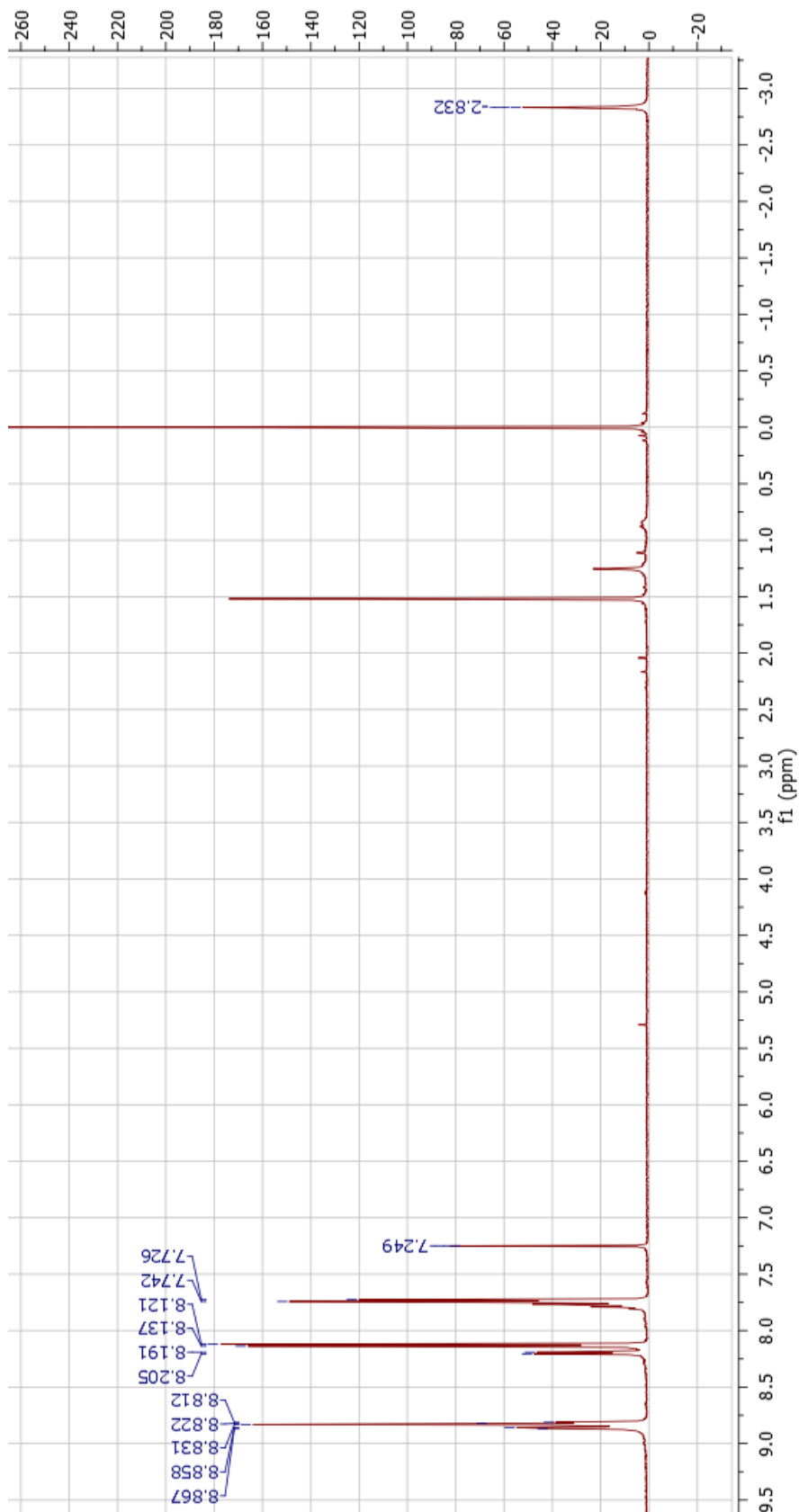


Figura 24. Espectro de RMN ^1H (400 Hz, CDCl_3) de NS2E.

En la siguiente ampliación del espectro (Figura 25), se definen con mayor claridad las señales de los protones unidos a los anillos aromáticos de *p*-clorofenilo y fenilo.

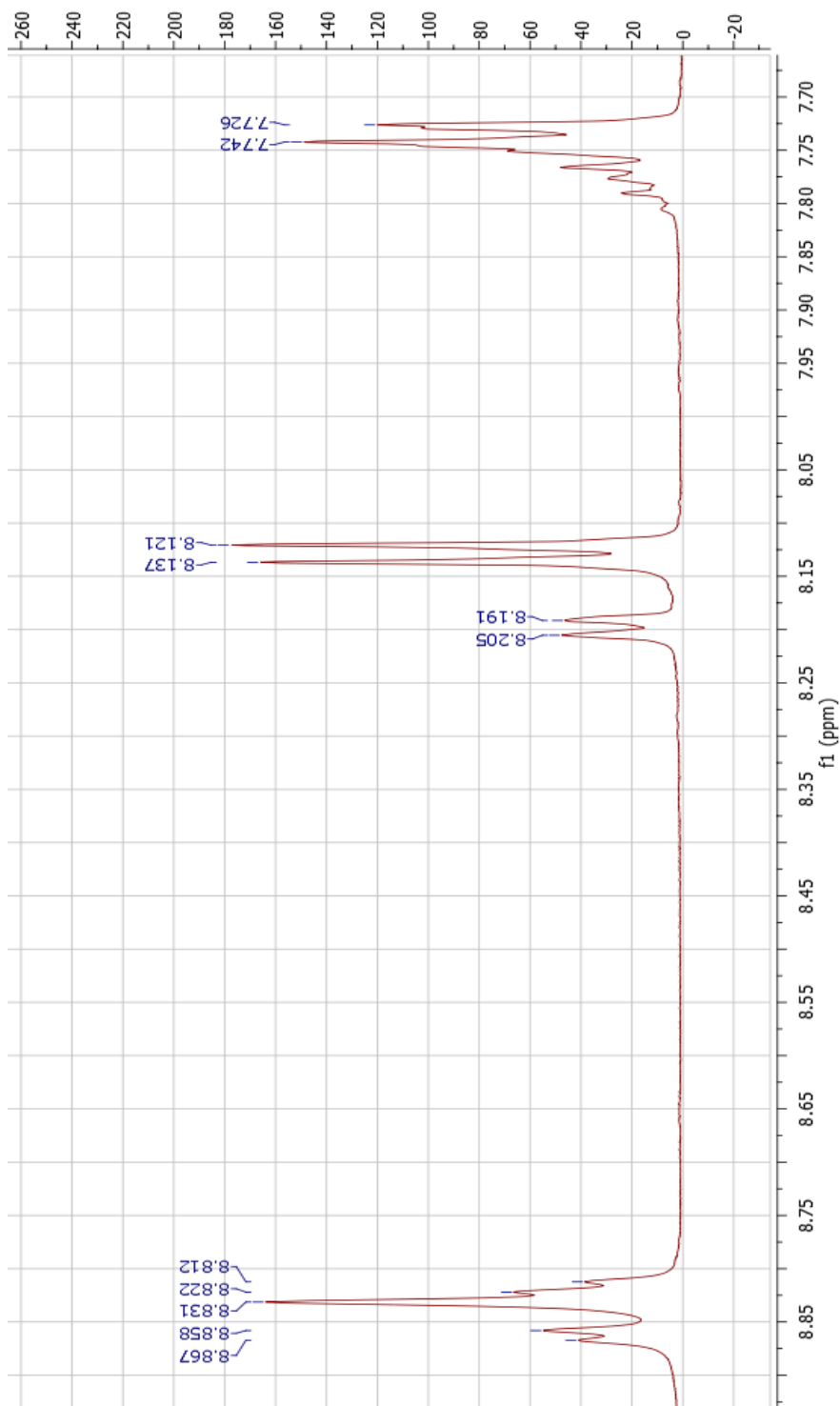


Figura 25. Ampliación del espectro de RMN ^1H de la porfirina NS2E.

A un desplazamiento químico de 7.73 ppm (*b*) aparece un doblete ($J = 8.0$) que integra para 6H y corresponde a los protones *meta* del *p*-clorofenilo. En 7.77 ppm (*c*) se observa un multiplete empalmado con el doblete de 7.73 ppm, dicho multiplete integra para 3 H y corresponde a los protones *meta* y *para* del fenilo. En 8.13 ppm (*d*) se encuentra un doblete ($J = 8.0$) que integra para 6 H, los protones en posición *orto* del *p*-clorofenilo. Adicionalmente en 8.20 ppm (*e*) se observa un doblete ($J = 6.9$) que integra para 2 H correspondientes a los protones *orto* del fenilo.

En 8.82 ppm (*f*) ($J = 4.8$) se observa un doblete que integra para 2 H, los protones del pirrol cercanos al *p*-clorofenilo. Inmediatamente después y empalmado con la señal anterior se observa un singulete en 8.83 ppm (*g*), esta señal integra para los 4 protones β del pirrol que están entre los 3 grupos *meso* *p*-clorofenilo. Finalmente en 8.86 ppm (*h*) se observa un doblete ($J = 4.6$) que integra para los 2 protones β del pirrol cercanos al fenilo. En la Figura 26 se marcan los protones escritos anteriormente en letras *minúsculas* y entre paréntesis, para que quede más clara la asignación dada a cada señal.

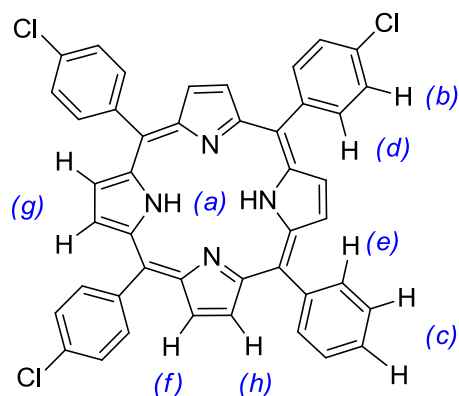


Figura 26. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H de la porfirina NS2E.

5.2.4.3. ESPECTRO MASAS.

Una vez realizado el análisis de espectrometría de masas de baja resolución, se obtuvo el espectro de fragmentación (Figura 27), se localizó el ion molecular $M^+ = 718$ y se comparó su relación masa/carga con la masa molecular de la porfirina NS2E (718.07 g/mol), por lo cual se puede confirmar que se tiene la molécula planteada.

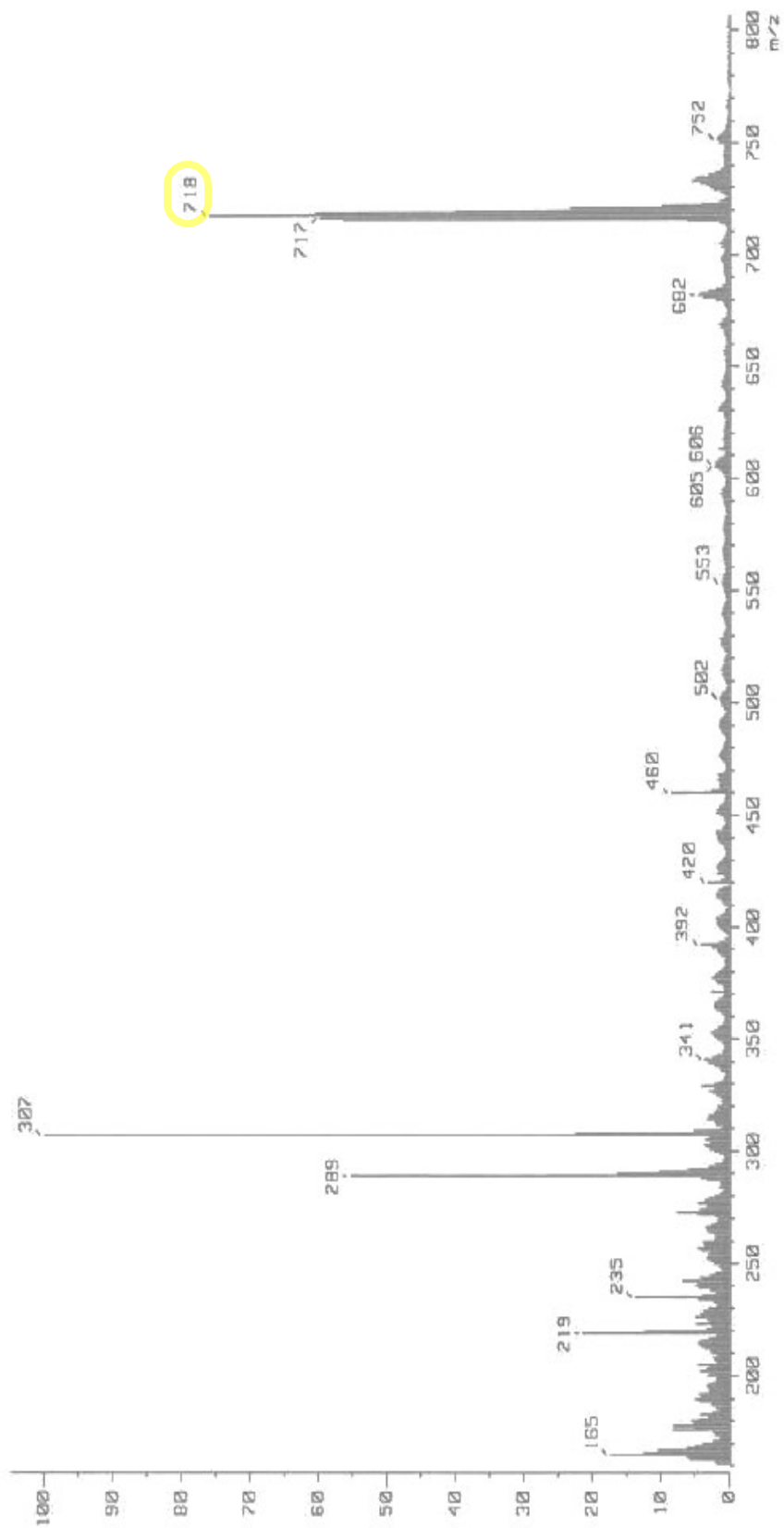


Figura 27. Espectro de masas de la porfirina NS2E.

5.2.4.4. MASAS ALTA RESOLUCIÓN.

El análisis de masas de alta resolución mostró una relación masa/carga (m/z) de 718.1547 y un porcentaje de pureza de 99.7%.

En la sección de anexos se compilaron los datos analíticos de la porfirina no simétrica NS2E.

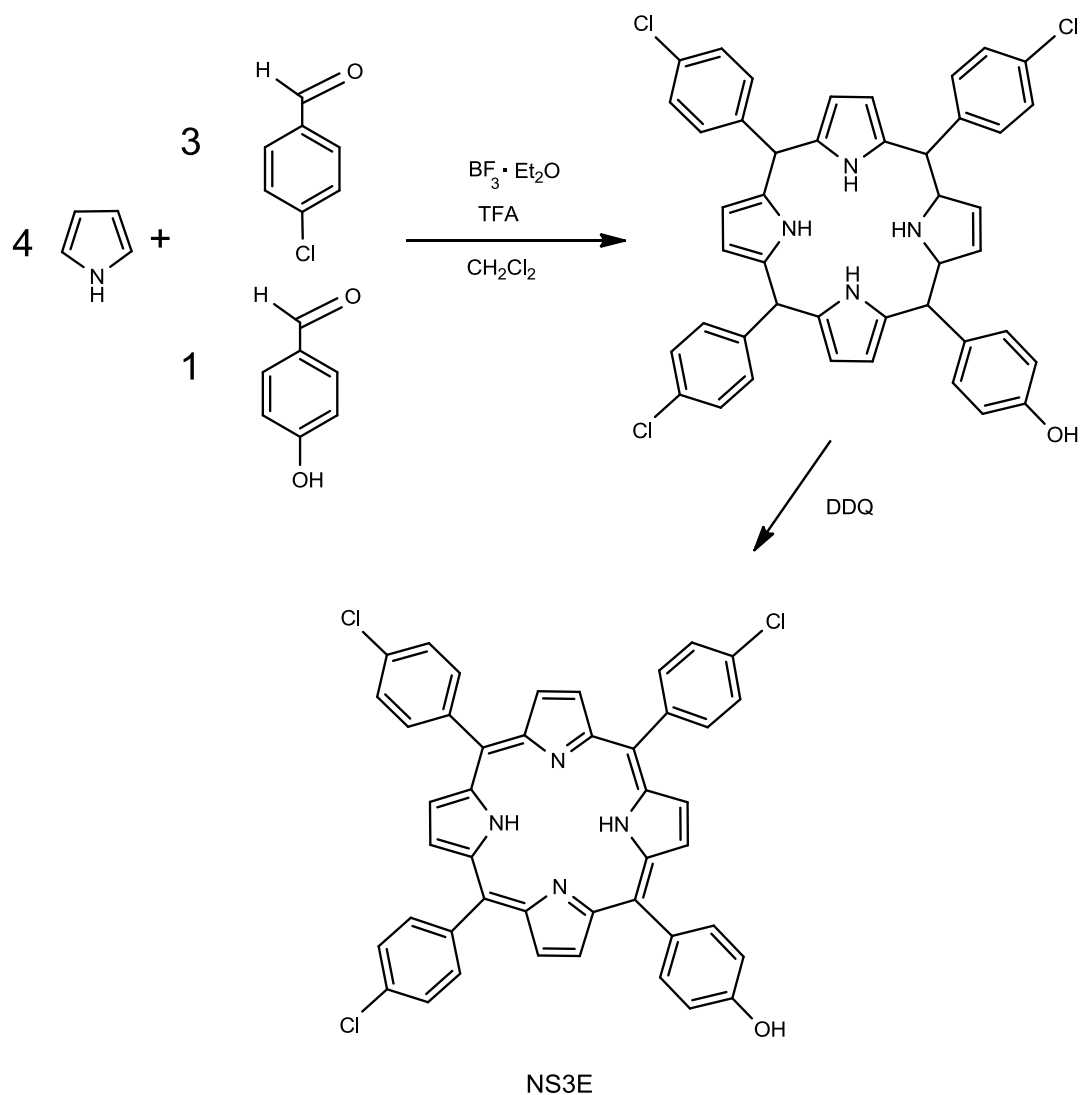
5.3. PORFIRINA NO SIMÉTRICA NS3E.

5.3.1. SÍNTESIS DE NS3E.

La síntesis de la porfirina no simétrica A₃B NS3E (A: *p*-clorofenilo, B: *p*-hidroxifenilo), se llevó a cabo utilizando el método de síntesis descrito por Lindsey con los siguientes reactivos (Tabla 11, Esquema 9):

Tabla 11. Reactivos empleados para la síntesis de la porfirina NS3E.

REACTIVO	n (mmol)	CANTIDAD
Pirrol	5	0.35 mL
<i>p</i> -Clorobenzaldehído	3.75	0.5267 g
<i>p</i> -Hidroxibenzaldehído	1.25	0.1526 g
Solución de BF ₃ ·Et ₂ O	9.7×10 ⁻²	1.2 mL
TFA	4.57	0.35 mL
DDQ	0.251	0.570 g



Esquema 9. Ruta sintética de la porfirina NS3E. Método de Lindsey.

Al inicio de la reacción la coloración era naranja oscuro - rojizo y cambió a color vino. Después de 2 h de reacción, se adicionó el DDQ y la coloración cambió a verde oscuro, la reacción continuó en agitación por 2 horas más.

5.3.2. PURIFICACIÓN DE NS3E.

La porfirina NS3E se logró purificar gracias a un proceso que implicó una serie de columnas cromatográficas. Sin embargo, al ser una porfirina con mayor polaridad que las anteriores, el objetivo se logró con un menor número de columnas cromatográficas. En la primera de ellas el objetivo era eliminar el DDQ, por lo que se empleó diclorometano como fase móvil; sin embargo, no se logró eluir el producto adicionado en la columna, por lo que se incrementó la polaridad a CH_2Cl_2 -isopropanol (99:1) y obteniendo una solución rosa pálido del producto porfirínico diluido. La elución de la columna se continuó con el sistema CH_2Cl_2 -Metanol (95:5) colectando fracciones de 100 mL de color violeta intenso, las cuales fueron monitoreadas con CCF.

Posteriormente, empezó a salir la solución de color verde oscuro y se siguieron obteniendo fracciones y monitoreando por CCF hasta que se dejó de observar la serie de manchas de las porfirinas en la cromatografía en capa fina. La columna cromatográfica utilizada fue de 3.5 cm de diámetro a la cual se empacó con gel de sílice disuelta en el sistema hasta una altura de 28 cm.

Una vez eliminado el subproducto anterior, se realizaron pruebas para conseguir una separación eficaz de las porfirinas que se obtuvieron como producto en la reacción. Los sistemas probados fueron: CH_2Cl_2 -hexano 8:2 y

7:3; CH₂Cl₂-isopropanol 99:1 y 9:1; CH₂Cl₂-Metanol 98:2 y 95:5. En el sistema CH₂Cl₂-Metanol 95:5 se observó la mejor separación. Como puede observarse en la Figura 28 a, se utilizaron las porfirinas simétricas S1E y la THFP (ver anexo 1) como referencia para la purificación y en base a la polaridad de los demás compuestos se asignó a la segunda mancha como la porfirina NS3E.

Para la segunda purificación, se eligió el sistema CH₂Cl₂- Metanol 95:5, se empacó una columna de 3.5 cm de diámetro con gel de sílice disuelta en el sistema a una altura de 21 cm; se colectaron las fracciones correspondientes y al realizar el monitoreo con CCF se observaron las dos primeras manchas de la fracción 1 - 40 y de la 41- 78 la tercera y cuarta mancha. Por lo anterior se decidió purificar únicamente las primeras fracciones para lograr la separación de la NS3E.

Posteriormente, se llevó a cabo otra prueba para elegir el sistema que separara mejor las dos primeras manchas y se observó que con diclorometano se daba una eficaz separación de la porfirina no simétrica A₃B (Figura 28 b). Se colectaron las fracciones, se juntaron aquellas que tenían el mismo factor de retención ($R_f = 0.46$), se concentraron y el producto obtenido se observó como un sólido de color morado.

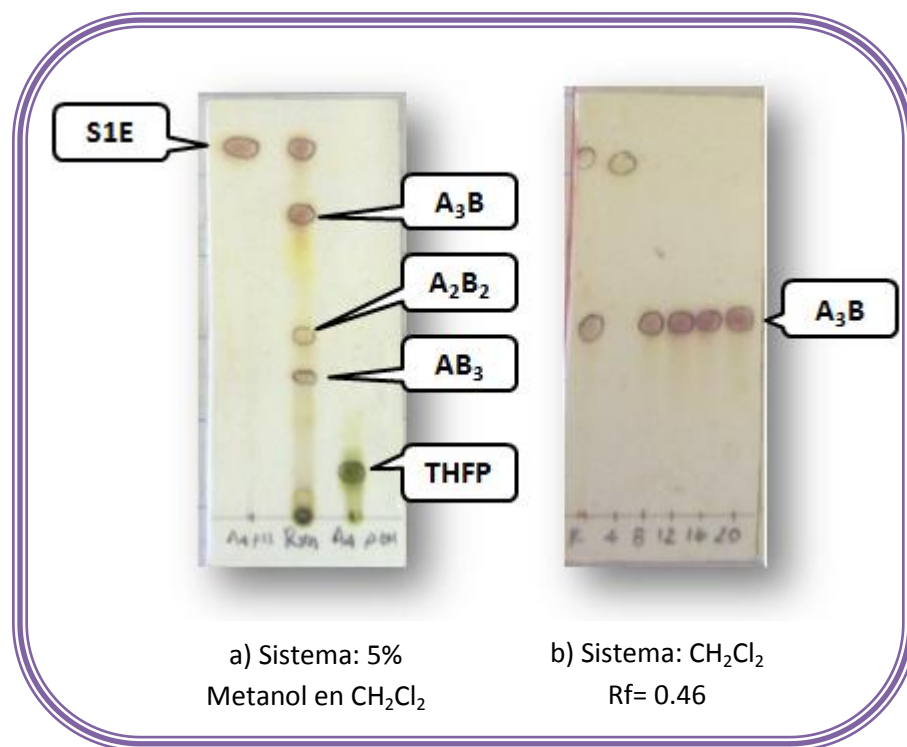


Figura 28. Cromatografía en capa fina de NS3E
a) Comparación de las diferentes porfirinas obtenidas, b) fracciones colectadas con la porfirina A_3B pura.

5.3.3. RENDIMIENTO DE NS3E.

La porfirina NS3E posee una masa molecular de 734.07 g/mol y después de realizar su purificación, se obtuvieron 194 mg, lo cual corresponde a un 21.14% de rendimiento. Cabe señalar que este fue el mayor rendimiento obtenido y, haciendo referencia específicamente a la síntesis de porfirinas A_3B , es un buen rendimiento, ya que la literatura reporta rendimientos entre el 10% y el 20%.³³

5.3.4. CARACTERIZACIÓN DE NS3E.

5.3.4.1. ESPECTRO UV-VIS.

Se preparó una solución de porfirina (0.5 mg/mL en diclorometano) para poder determinar cualitativamente si el compuesto obtenido mostraba el patrón característico de las porfirinas. Como muestra la Figura 29, se obtuvo el patrón característico de las porfirinas, el máximo de la banda Soret se observó en 418 nm mientras que las cuatro bandas Q aparecen en 515, 551, 590 y 646 nm.

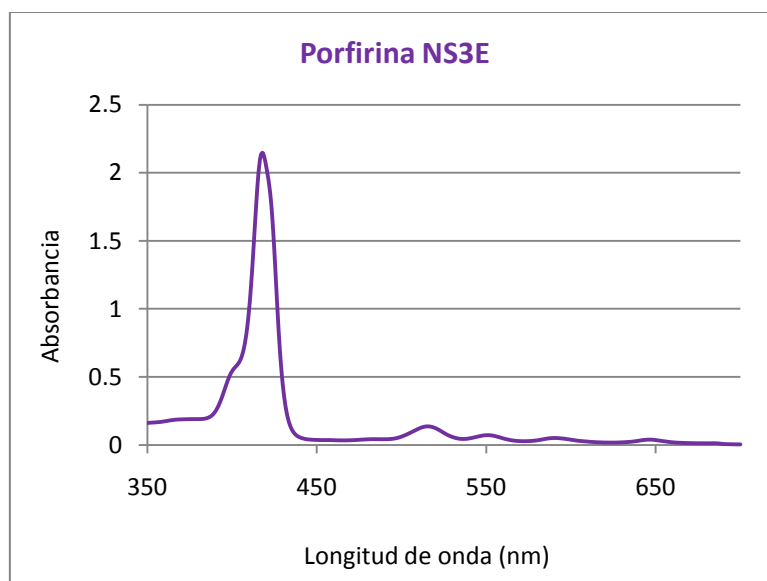


Figura 29. Espectro UV-Vis de la porfirina NS3E.

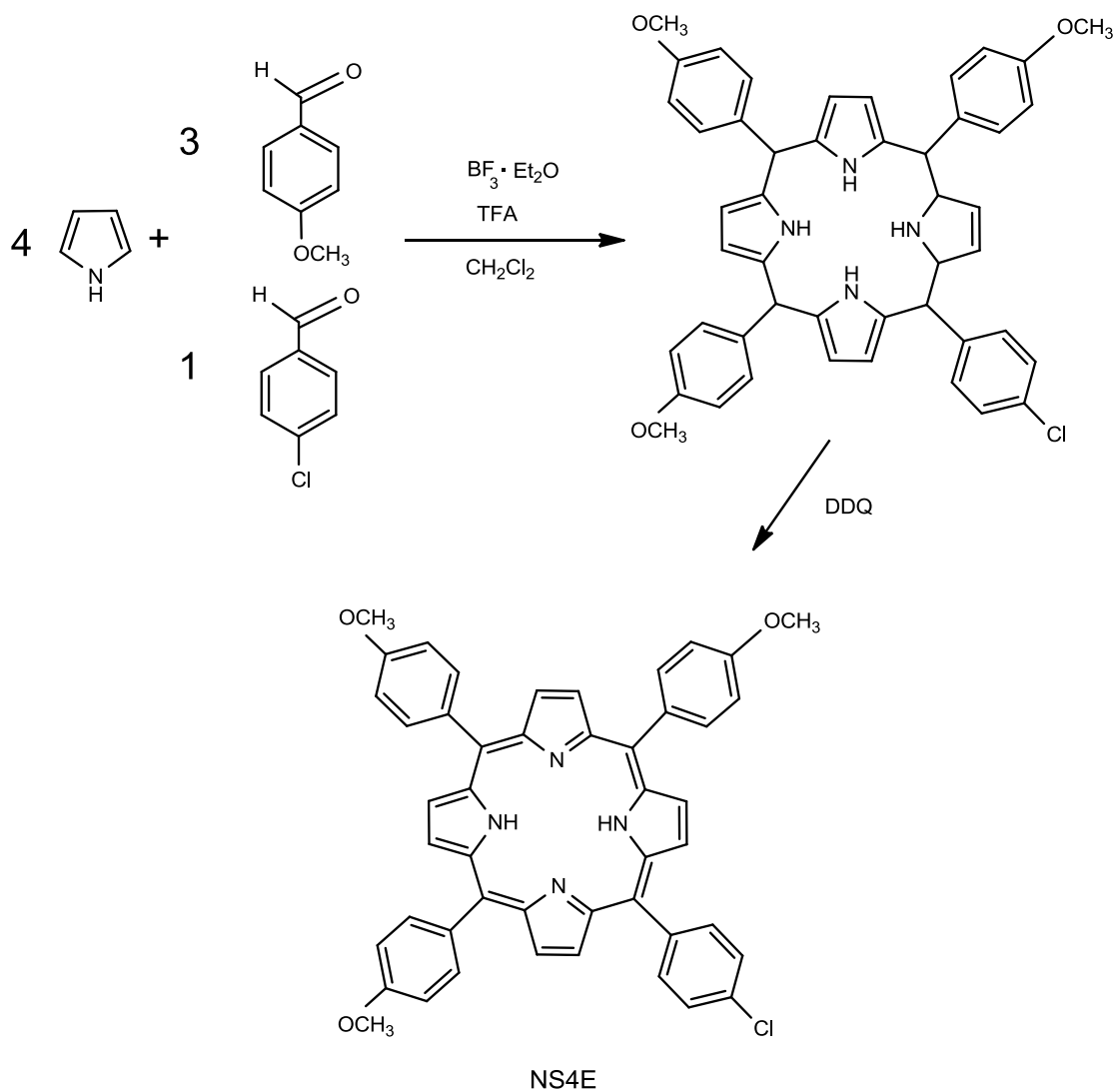
5.3.4.2. ESPECTRO RMN ¹H.**5.3.4.3. ESPECTRO MASAS.****5.3.4.4. MASAS ALTA RESOLUCIÓN.****5.4. PORFIRINA NO SIMÉTRICA NS4E.****5.4.1. SÍNTESIS DE NS4E.**

La síntesis de la porfirina no simétrica A₃B (A: *p*-metoxifenilo, B: *p*-clorofenilo) (NS4E) se llevó a cabo por el método de síntesis descrito por Lindsey, con los siguientes reactivos (Tabla 12).

Tabla 12. Reactivos empleados para la síntesis de la porfirina NS4E.

REACTIVO	n (mmol)	CANTIDAD
Pirrol	5	0.35 mL
<i>p</i> -Metoxibenzaldehído	3.75	0.45 mL
<i>p</i> -Clorobenzaldehído	1.25	0.1756 g
Solución de BF ₃ ·Et ₂ O	9.7x10 ⁻²	1.2 mL
TFA	4.57	0.35 mL
DDQ	0.251	0.570 g

El color de la mezcla de la reacción al inicio era naranja oscuro y cambió a color vino. El DDQ se agregó una vez transcurridas las 2 h de reacción y se observó un cambio de la coloración de la reacción, de color vino a verde oscuro.



Esquema 10. Ruta sintética de la porfirina NS4E. Método de Lindsey.

5.4.2. PURIFICACIÓN DE NS4E.

La purificación de la porfirina NS4E se logró con menor dificultad que la presentada en los compuestos NS1E, NS2E y NS5E debido a que esta porfirina resultó ser más polar que las anteriores y por lo tanto se eligió un sistema con

mayor polaridad en el cual NS4E presentaba mayor solubilidad que en el caso de las otras porfirinas mencionadas, por lo que la cantidad purificada por columna fue mayor y por consiguiente se requirieron menor número de columnas para completar la purificación teniendo por lo tanto, menos pérdida de producto.

Una columna cromatográfica de 3.5cm de diámetro se empacó con gel de sílice disuelta en el sistema CH_2Cl_2 -Hexano 7:3, el crudo de reacción fue disuelto en el sistema y adsorbido en gel de sílice para su aplicación en la columna. Se obtuvieron 28 fracciones de color rosa claro por lo cual se incrementó la polaridad a CH_2Cl_2 -isopropanol 99:1 y comenzaron a salir más concentradas; se siguió colectando hasta la fracción 132 y se realizó el monitoreo de las fracciones por cromatografía en capa fina. Se juntaron las fracciones con igual R_f y se concentraron mediante rotaevaporación.

Posteriormente, las fracciones que tenían más de una mancha, se juntaron y prepararon para una posterior purificación, la cual se llevó a cabo en una columna cromatográfica de 1.8 cm de diámetro previamente empacada con gel de sílice a una altura de 29 cm. La columna se eluyó con el sistema CH_2Cl_2 :Hexano 1:1. Colectando 72 fracciones de color rosa mexicano. Para la purificación se utilizó como referencia la porfirina S1E y S2E (ver anexo 1), teniendo como base al R_f de estas dos porfirinas, se asignaron las otras 3

manchas presentes de acuerdo a la polaridad de los productos esperados y se asignó que la porfirina A_3B correspondía a la mancha número 3 del crudo de reacción (

Figura 30). Se concentraron las fracciones con igual factor de retención ($R_f = 0.49$) por rotaevaporación y producto se observó como un sólido de color morado.

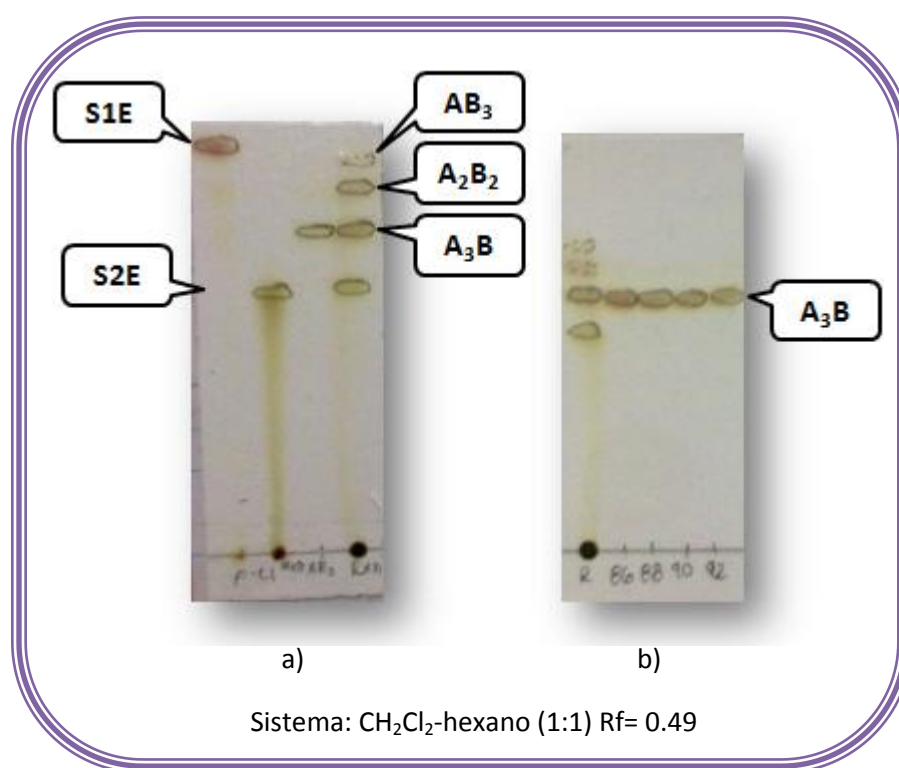


Figura 30. Cromatografía en capa fina de NS4E
a) Comparación de las diferentes porfirinas obtenidas, b) fracciones colectadas con la porfirina A_3B pura.

5.4.3. RENDIMIENTO DE NS4E.

Posterior a la purificación, se obtuvieron 138.4 mg de la porfirina NS4E cuya masa molecular es de 739.26 g/mol y esto corresponde a un rendimiento de

15%. Cabe señalar que junto con la NS3E y NS6E, este fue uno de los mayores rendimientos obtenidos.

5.4.4. CARACTERIZACIÓN DE NS4E.

5.4.4.1. ESPECTRO UV-VIS.

Se realizó una lectura espectrofotométrica de una solución de porfirina (0.7 mg/mL en diclorometano) para determinar si el compuesto mostraba el patrón de las porfirinas. Como se observa en la Figura 31, se obtuvo el patrón característico de las porfirinas. El máximo de la banda Soret se observó en 430 nm mientras que las cuatro bandas Q aparecen en 517, 554, 593 y 649 nm.

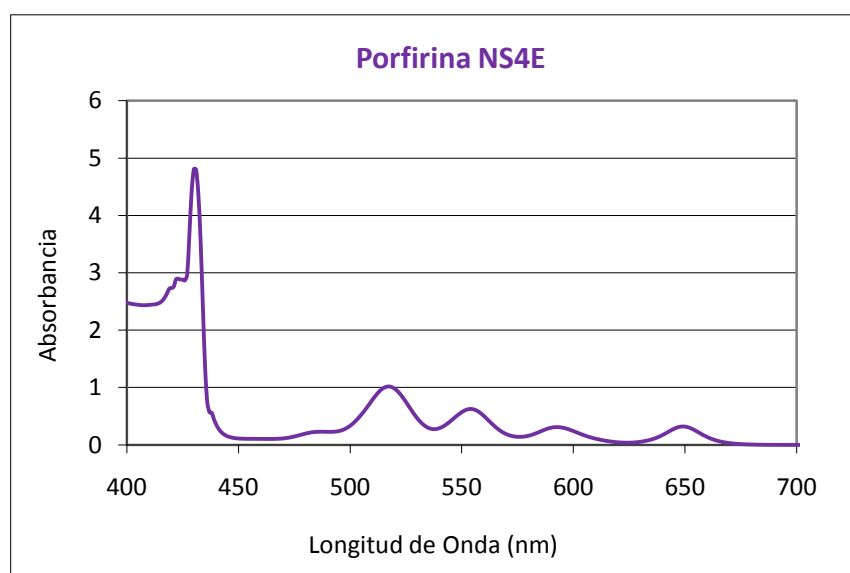


Figura 31. Espectro UV-Vis de la porfirina NS4E.

5.4.4.2. ESPECTRO RMN ^1H .

Se llevó a cabo el análisis de Resonancia Magnética Nuclear de Protón y se obtuvo el espectro que contenía varias señales a diferentes desplazamientos químicos (δ ppm), una vez analizados todos los parámetros de utilidad, se llevó a cabo la asignación de las señales con los protones presentes en la molécula.

La Figura 32 muestra el espectro que se obtuvo en el análisis, la primera señal de interés es un singulete presente a un desplazamiento químico de -2.77 ppm (*a*), esta señal integra para los 2 protones unidos al N dentro del macrociclo aromático. A 4.09 ppm (*b*) se tiene otro singulete que integra para 3 protones: los del metoxilo unido al fenilo.

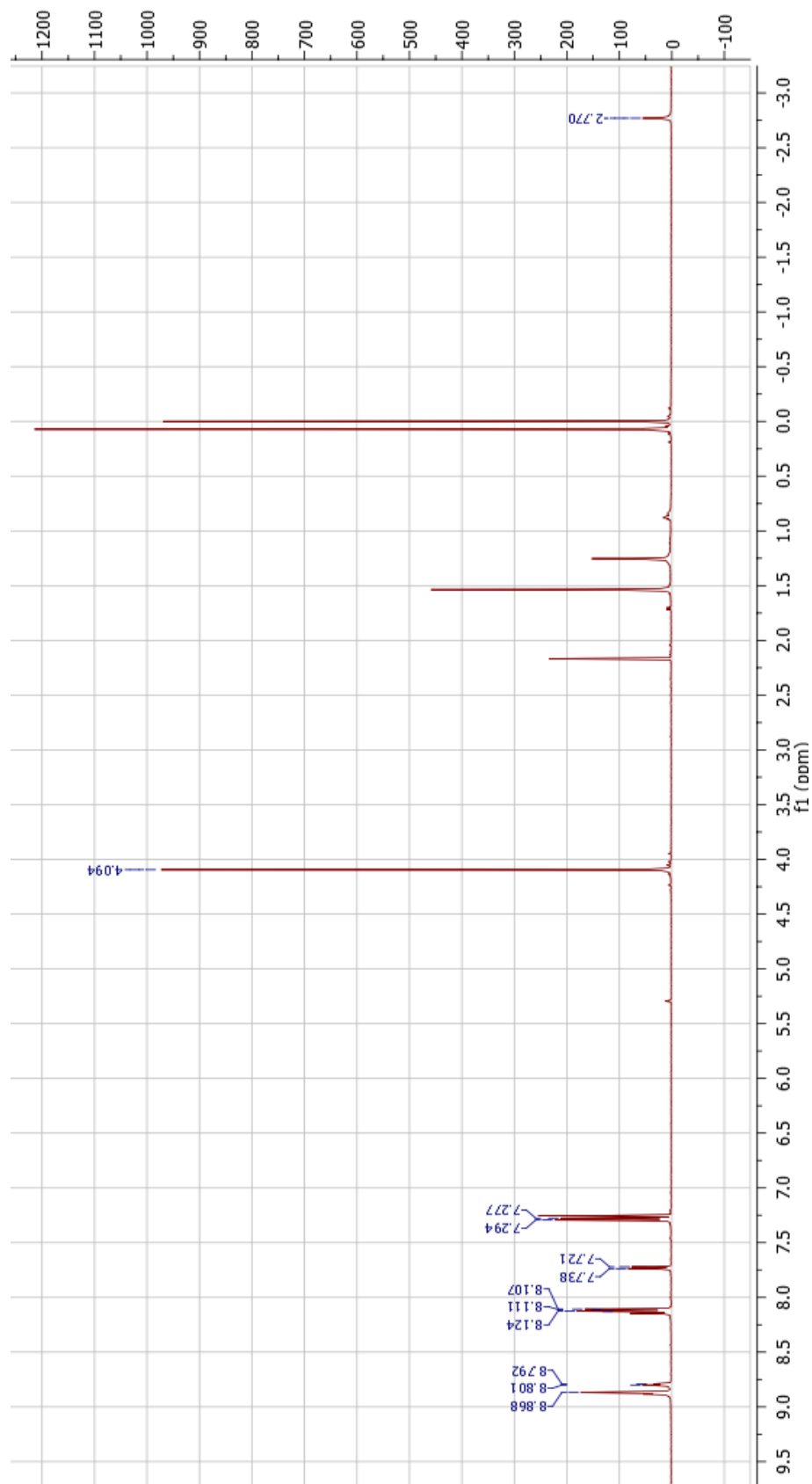


Figura 32. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de la porfirina NS4E.

En la ampliación del espectro mostrada en la Figura 33, se muestran con mayor claridad las señales de los protones restantes.

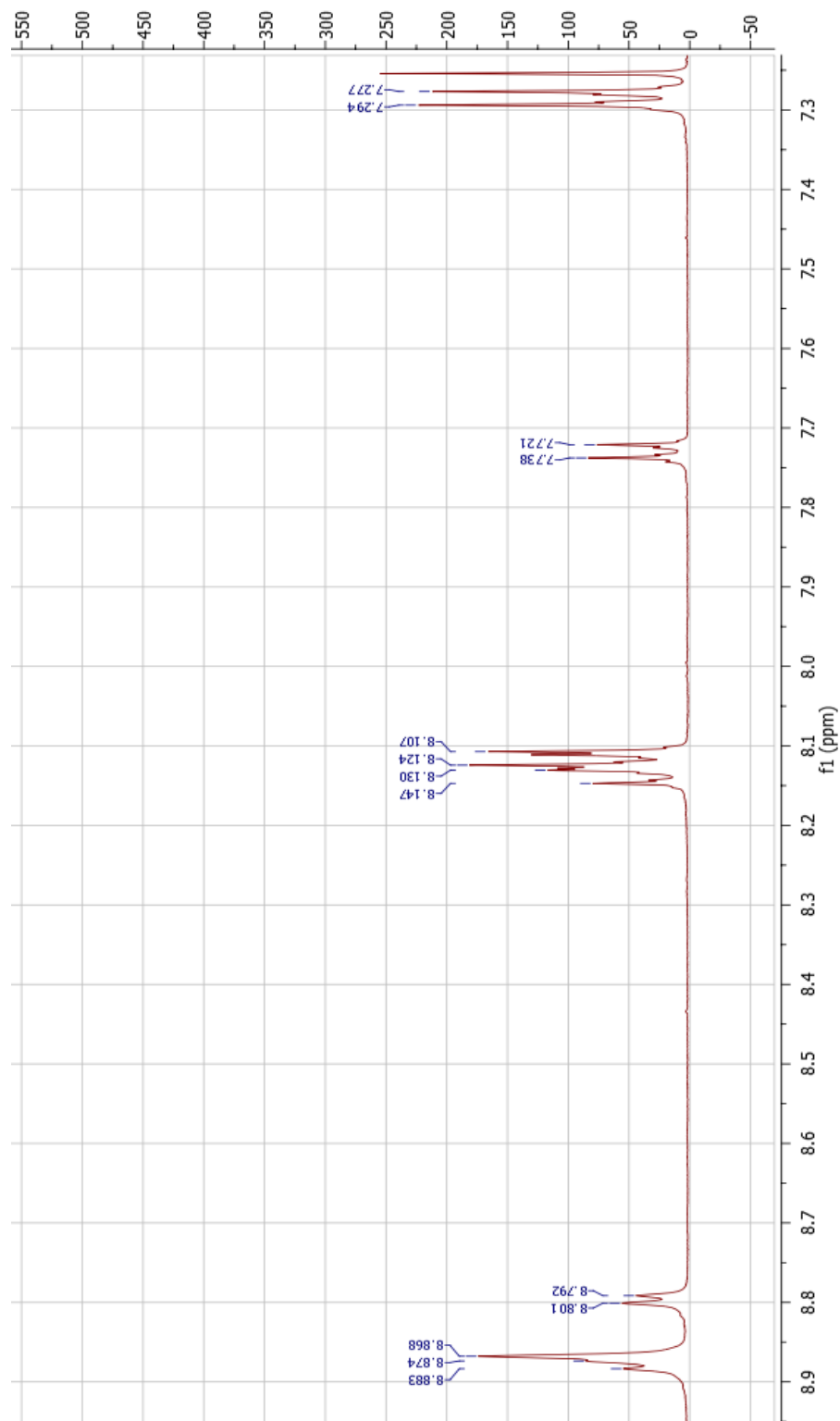


Figura 33. Ampliación del espectro de RMN ^1H de la porfirina NS4E.

En 7.28 ppm (*c*) se observa un doblete ($J = 8.6$) que integra para 6 H, los protones *meta* del *p*-metoxifenilo. A un δ de 7.73 ppm (*d*) se encuentra un doblete ($J = 8.3$) que integra para 2 H, los protones en posición *meta* del *p*-clorofenilo. A continuación están dos señales empalmadas, en 8.12 ppm (*e*) está un doblete ($J = 8.5$) que integra para 6 H, los protones *orto* del *p*-metoxifenilo; en 8.14 ppm (*f*) está otro doblete ($J = 8.3$) que integra para 2 protones *orto* del *p*-clorofenilo. A un desplazamiento químico de 8.80 ppm (*g*), se observa un doblete ($J = 4.7$) que integra para 2 H, los protones β del pirrol cercanos al *p*-metoxifenilo. En 8.87 ppm (*h*) se observa un singulete que integra para los 4 H β del pirrol que están entre los 3 sustituyentes *meso p*-metoxifenilo. Finalmente a 8.88 ppm (*i*) se observa un doblete ($J = 4.9$) que integra para los 2 H β del pirrol cercanos al *p*-clorofenilo. En la Figura 34 se marcan los protones descritos anteriormente en letras *minúsculas* y entre paréntesis, para aclarar la asignación dada a cada señal.

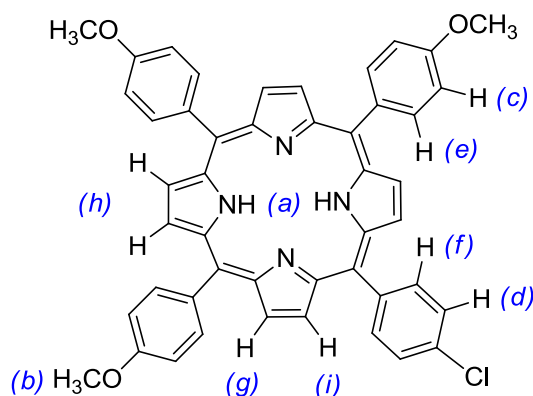


Figura 34. Asignación a las señales del espectro de RMN ¹H de la porfirina NS4E.

5.4.4.3. ESPECTRO MASAS.

El espectro de fragmentación obtenido (Figura 35) en el análisis de EM de baja resolución (FAB), mostró la relación m/z del ion M^{+1} en 740 y se comparó con la masa molecular de NS4E (739.26 g/mol) estableciendo que el compuesto sintetizado y purificado corresponde a la porfirina de interés.

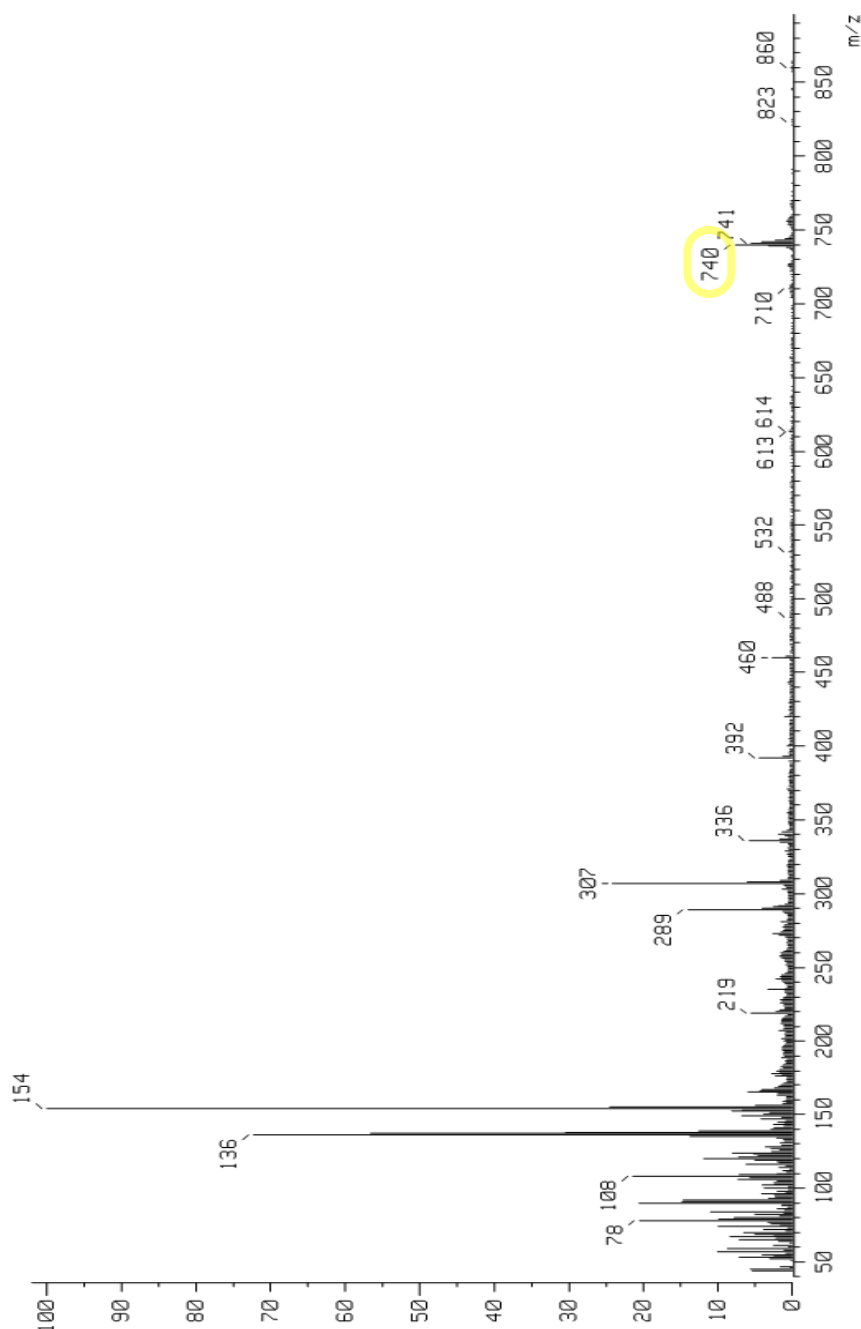


Figura 35. Espectro de masas de la porfirina NS4E.

5.4.4.4. MASAS ALTA RESOLUCIÓN.

El análisis de Masas de alta resolución mostró una relación masa/carga (m/z) de 739.2482 y un porcentaje de pureza de 99.9%

Los datos analíticos completos de la porfirina no simétrica NS4E se presentan en anexos.

5.5. PORFIRINA NO SIMÉTRICA NS5E.

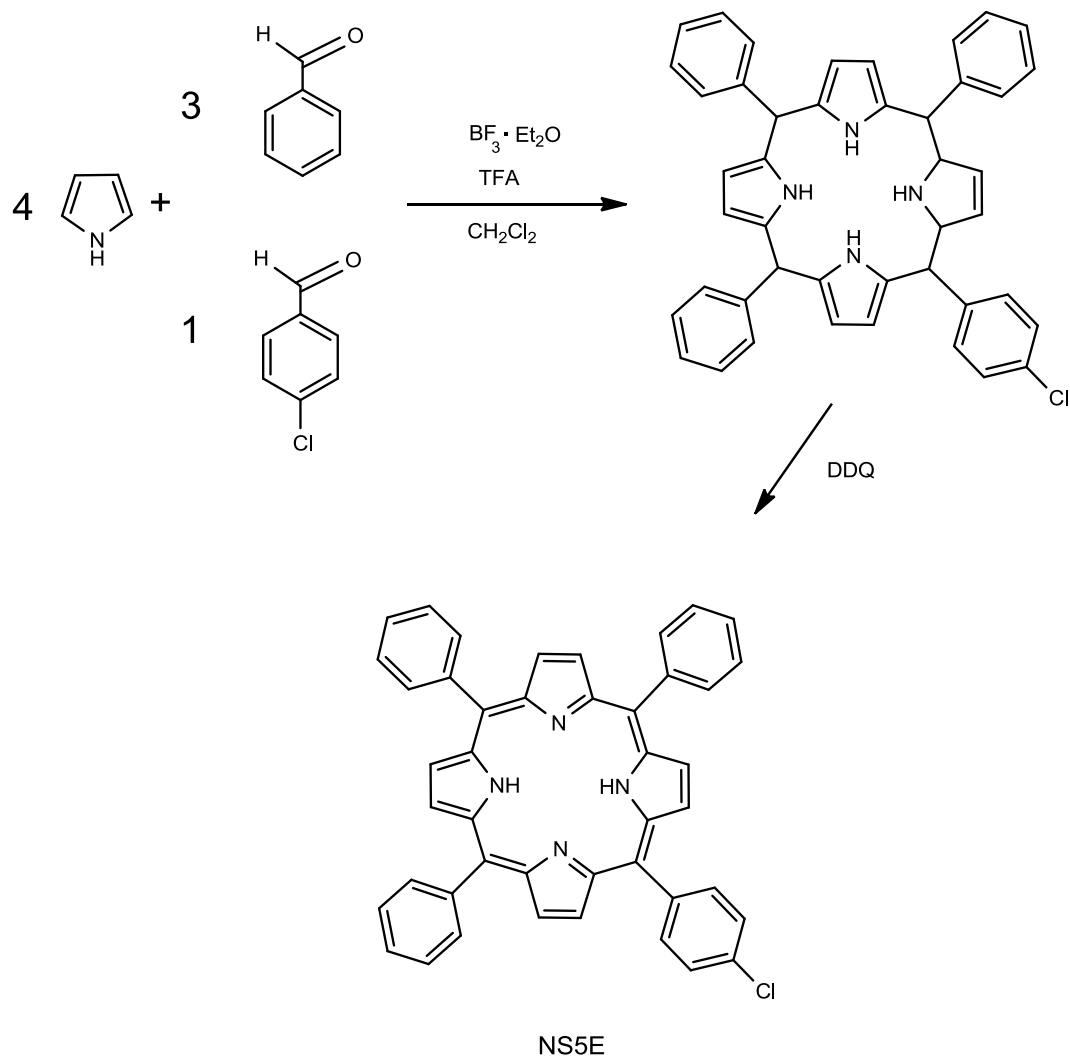
5.5.1. SÍNTESIS DE NS5E.

La porfirina no simétrica A₃B (A: fenilo, B: *p*-clorofenilo) (NS5E) se sintetizó siguiendo el método descrito por Lindsey (Tabla 13):

Tabla 13. Reactivos empleados para la síntesis de la porfirina NS5E.

REACTIVO	n (mmol)	CANTIDAD
Pirrol	5	0.35 mL
Benzaldehído	3.75	0.38 mL
<i>p</i> -Clorobenzaldehído	1.25	0.1756 g
Solución de BF ₃ Et ₂ O	9.7x10 ⁻²	1.2 mL
TFA	4.57	0.35 mL
DDQ	0.251	0.570 g

Una vez iniciada la reacción (Esquema 11), se observó una coloración naranja oscuro-vino. Después de las 2 primeras horas de reacción, se agregó el DDQ y la coloración cambio a verde oscuro, la reacción siguió por 2 horas más.



Esquema 11. Ruta sintética de la porfirina NS5E. Método de Lindsey.

5.5.2. PURIFICACIÓN DE NS5E.

La purificación de NS5E se inició eliminando el DDQ del crudo de reacción mediante columna cromatográfica utilizando CH_2Cl_2 como fase móvil. Posteriormente se intentó purificar cada una de las porfirinas obtenidas como producto de reacción. Se realizaron varias pruebas en diferentes sistemas

como: Acetato de Etilo-Hexano 7:3; 1:1; 3:7, CH₂Cl₂-Hexano 7:3, 1:1; 2:3; 3:7; 1:9, finalmente se optó por la elección del sistema Hexano-CH₂Cl₂ 7:3, pero debido a la cercanía presentada entre cada compuesto, se decidió emplear una columna alta para lograr una eficiente separación. Se utilizó una columna de vidrio de 1.2 cm de diámetro la cual se empacó con gel de a una altura de 70 cm. El producto se adicionó a la columna con el proceso descrito anteriormente para las porfirinas de baja polaridad, se solubilizó el producto en el sistema empleado y se tomó únicamente lo soluble, posteriormente fue adsorbido en gel de sílice y agregado a la columna para su purificación.

Las porfirinas simétricas S1E y S3E fueron utilizadas como referencia en la CCF para asignar en base a la polaridad el tipo porfirina presente en el crudo de reacción. Comparando el factor de retención de las diferentes manchas observadas (Figura 36).

Debido a la problemática presentada para lograr la purificación de la porfirina NS5E, se siguió estrictamente el protocolo mencionado y después de realizar 21 columnas, se obtuvieron 43.2 mg de un sólido color morado.

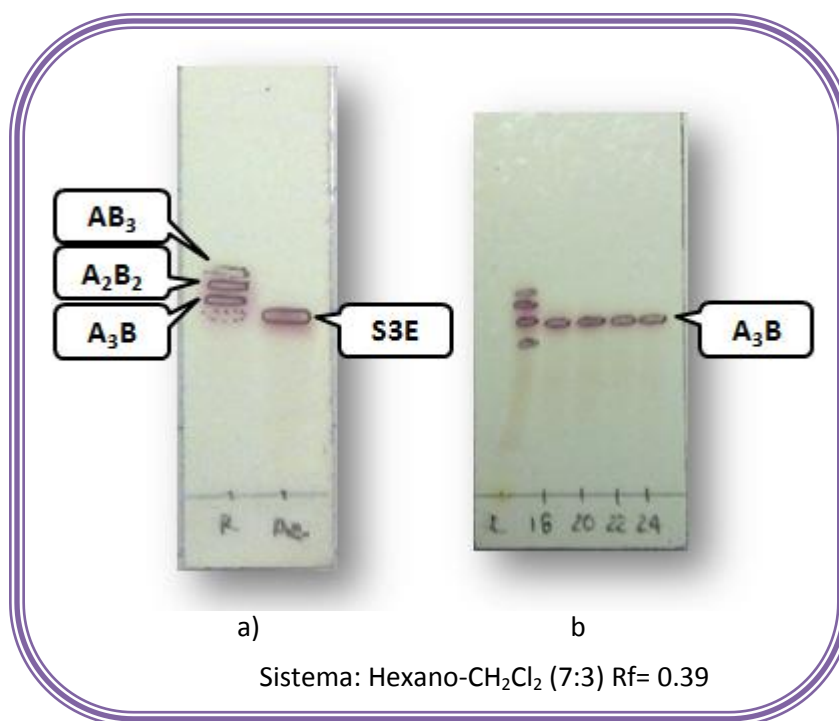


Figura 36. Cromatografía en capa fina de NS5E

a) Comparación de las diferentes porfirinas obtenidas, b) fracciones colectadas con la porfirina A_3B pura.

5.5.3. RENDIMIENTO DE NS5E.

El rendimiento correspondiente a la síntesis de la NS5E fue bajo debido al número de cromatografías en columna que se tuvieron que realizar y a las pruebas hechas para la elección del solvente. Finalmente los 43.2 mg de la NS5E (649.18 g/mol) corresponden a un 5.3% de rendimiento.

5.5.4. CARACTERIZACIÓN DE NS5E.

5.5.4.1. ESPECTRO UV-VIS.

La Figura 37 muestra el espectro UV-Vis obtenido de una solución de porfirina (0.5 mg/mL) en diclorometano. El máximo de la banda Soret se observó en 413 nm y las cuatro bandas Q en 514, 549, 591 y 645 nm.

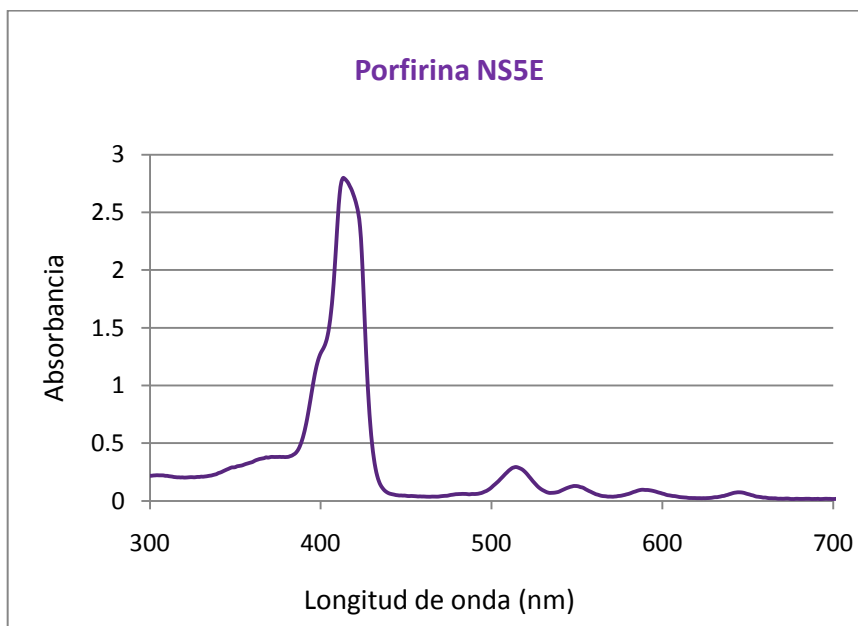


Figura 37. Espectro UV-Vis de la porfirina NS5E.

5.5.4.2. ESPECTRO RMN ^1H .

El espectro de RMN ^1H (Figura 38) muestra una señal con δ de -2.79 ppm (*a*), un singlete que integra para los 2 protones unidos al N del macrociclo aromático.

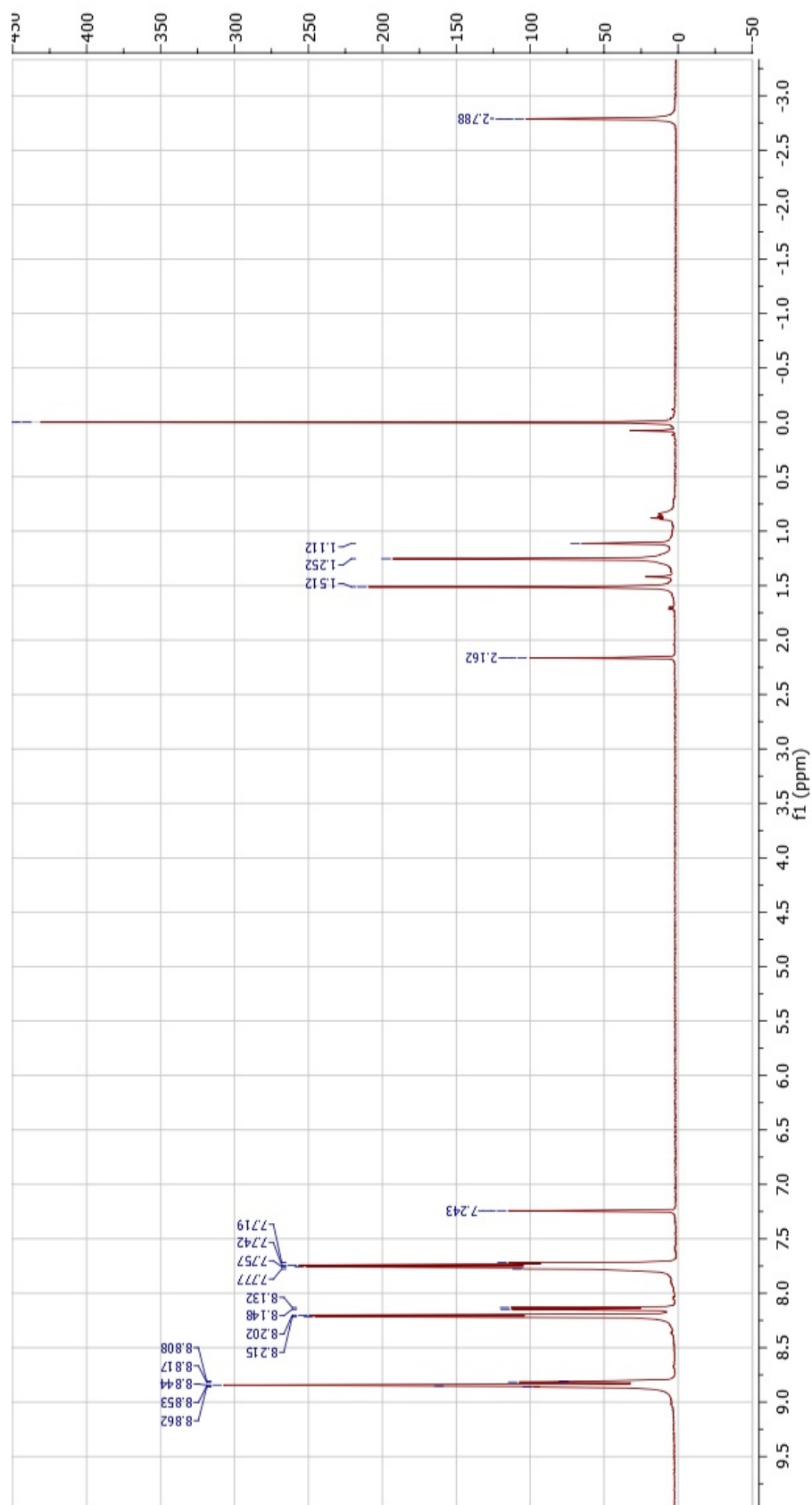


Figura 38. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de la porfirina NS5E.

En la ampliación del espectro mostrada en la Figura 39, se observan con mayor claridad las señales de los protones restantes.

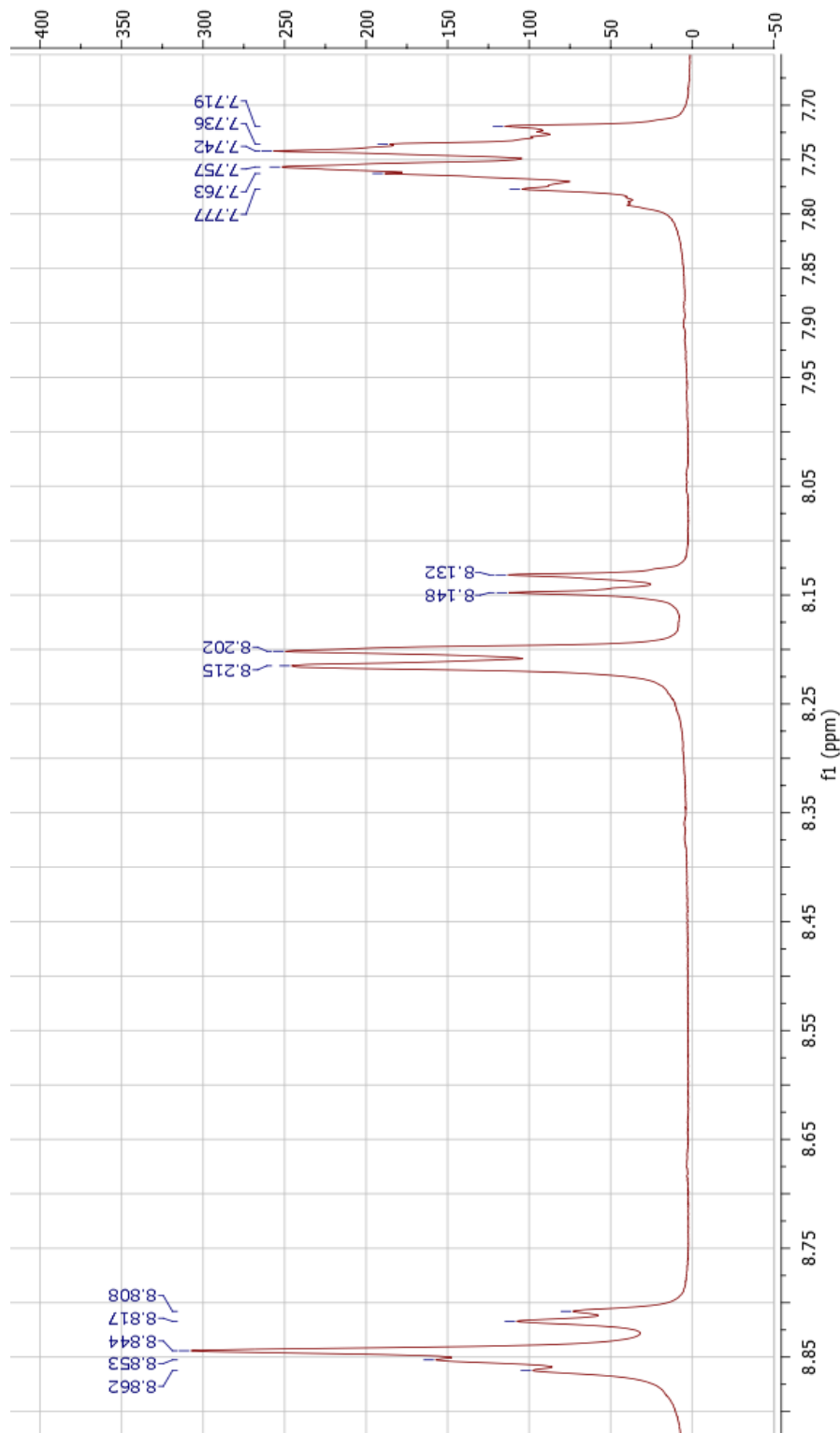


Figura 39. Ampliación del espectro de RMN ^1H de la porfirina NS5E.

A 7.73 ppm (*b*) se tiene un doblete ($J = 8.2$) que integra para 2 protones: los H *meta* del *p*-clorofenilo. En 7.76 ppm (*c*) se observa un multiplete empalmado con la señal anterior, que integra para 9 H, los protones *meta* y *para* del fenilo. A un desplazamiento químico de 8.14 ppm (*d*) se observa un doblete ($J = 8.1$) que integra para 2 H, los protones en posición *orto* del *p*-clorofenilo.

Posteriormente, en 8.21 ppm (*e*) se observa un doblete ($J = 6.6$) que integra para 6 H, los protones *orto* del fenilo. A un desplazamiento químico de 8.81 ppm (*f*) se muestra un doblete ($J = 4.6$) que integra para 2 protones, los protones β del pirrol cercano al *p*-clorofenilo. En 8.84 ppm (*g*), se observa un singulete que integra para los 4 protones β del pirrol que se encuentran entre los tres grupos fenilo en *meso*.

Finalmente en 8.86 ppm (*h*) se observa un doblete ($J = 4.8$) empalmado con el singulete anterior, este doblete integra para los 2 protones β del pirrol cercanos al fenilo. En la Figura 40 se marcan los protones descritos anteriormente en letras *minúsculas* y entre paréntesis, para aclarar la asignación dada a cada señal.

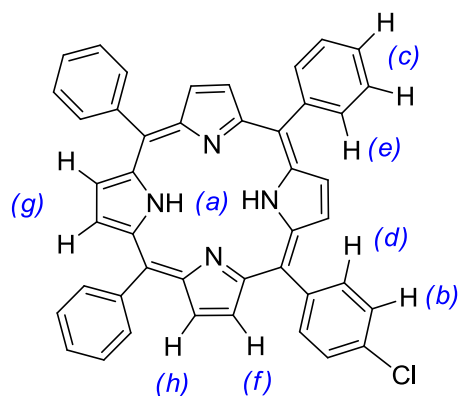


Figura 40. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H de la porfirina NS5E.

5.5.4.3. ESPECTRO MASAS.

El espectro de fragmentación (Figura 41) obtenido en el análisis de espectrometría de masas de baja resolución (ionización FAB), mostró la relación masa/carga (m/z) del ion molecular. La masa molecular de la porfirina NS5E es de 649.18 g/mol y la relación masa/carga (m/z) del ion molecular M^+ fue de 649, por lo cual se puede afirmar que el compuesto sintetizado y purificado corresponde a la porfirina NS5E.

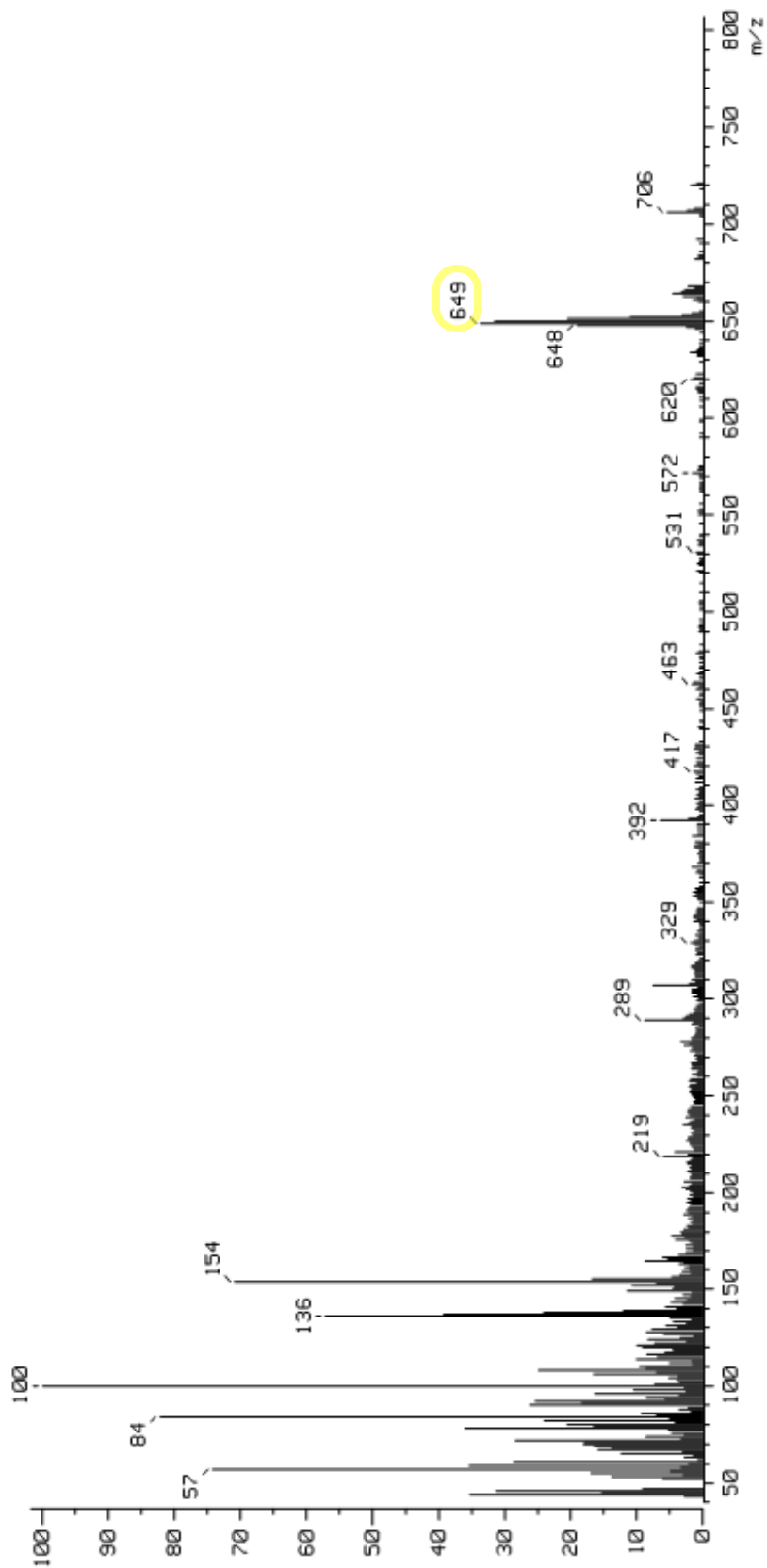


Figura 41. Espectro de masas de la porfirina NS5E.

5.5.4.4. MASAS ALTA RESOLUCIÓN.

El análisis de Masas de alta resolución mostró una relación masa/carga (m/z) de 649.2119 y una pureza de 99.8%

En la sección de anexos, se presenta un resumen con los datos analíticos de la porfirina no simétrica NS5E.

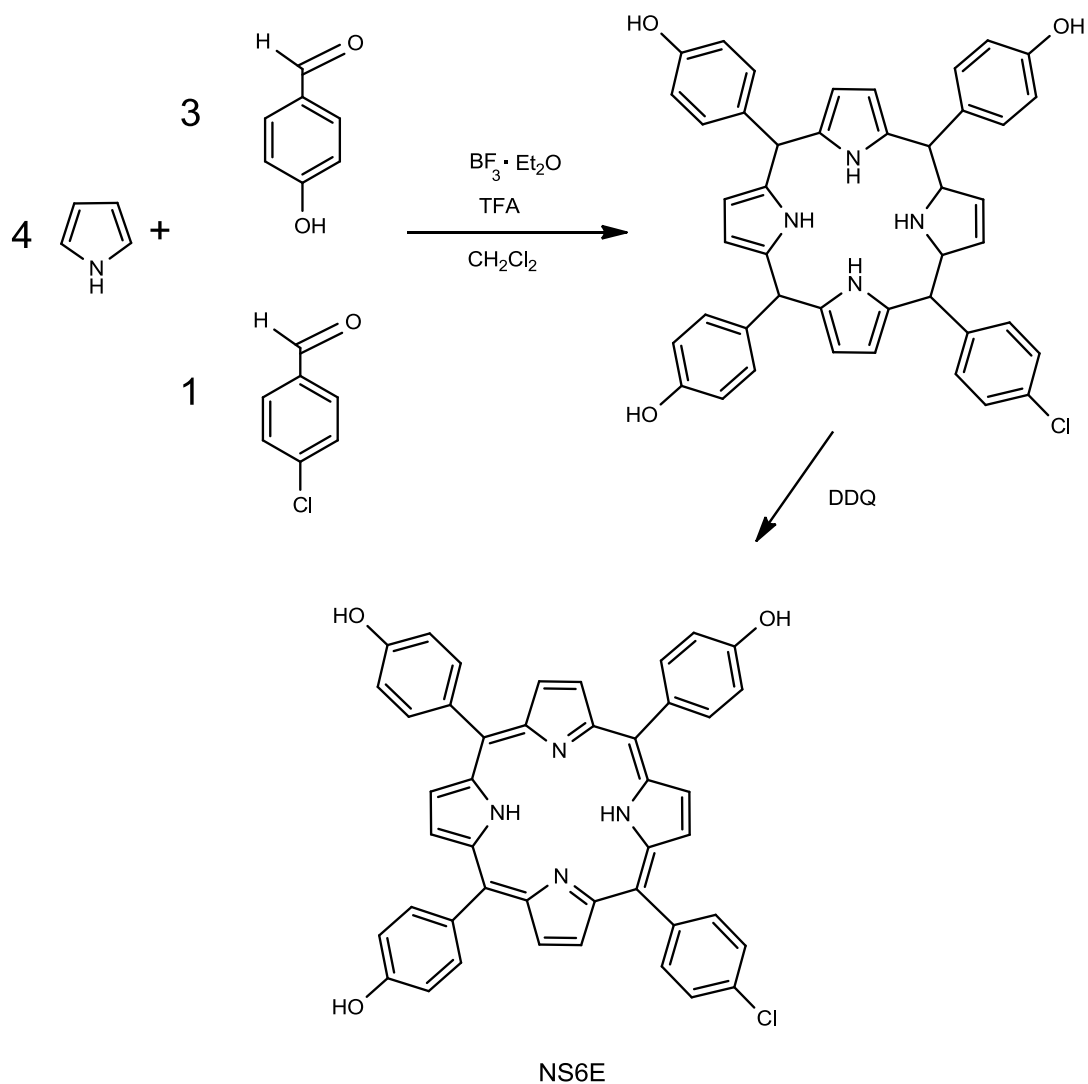
5.6. PORFIRINA NO SIMÉTRICA NS6E.

5.6.1. SÍNTESIS DE NS6E.

La porfirina no simétrica A₃B NS6E (A: *p*-hidroxifenilo, B: *p*-clorofenilo) se sintetizó siguiendo el método descrito por Lindsey (Tabla 14, Esquema 12):

Tabla 14. Reactivos empleados para la síntesis de la porfirina NS6E.

REACTIVO	n (mmol)	CANTIDAD
Pirrol	5	0.35 mL
<i>p</i> -Hidroxibenzaldehído	3.75	0.458 g
<i>p</i> -Clorobenzaldehído	1.25	0.1756 g
Solución de BF ₃ ·Et ₂ O	9.7x10 ⁻²	1.2 mL
TFA	4.57	0.35 mL
DDQ	0.251	0.570 g



Esquema 12. Ruta sintética de la porfirina NS6E. Método de Lindsey.

Al inicio de la reacción, la solución tenía una coloración amarillo- naranja oscuro. Después de las 2 primeras horas de reacción, se agregó el DDQ y la coloración cambio a azul oscuro- negro, la reacción siguió por 2 horas más.

5.6.2. PURIFICACIÓN DE NS6E.

La porfirina NS6E se logró purificar gracias a un proceso similar al descrito en las porfirinas polares. Sin embargo, al ser la porfirina con mayor polaridad, se tuvo problemas al intentar eliminar el subproducto color negro que regularmente se quedaba en la columna cromatográfica, ya que la NS6E poseía una polaridad similar al subproducto mencionado. La primera purificación se realizó en una columna de vidrio de 3.5 cm de diámetro empacada con gel de sílice hasta una altura de 17 cm, utilizando como fase móvil un gradiente de 0 a 10% de metanol en CH_2Cl_2 , aunque el objetivo de esta primera purificación era eliminar el DDQ, no se logró por completo debido a la semejanza de polaridad entre la porfirina NS6E y el subproducto de color negro; aún con dicha situación se logró reducir la cantidad del subproducto y se continuó con las siguientes purificaciones.

La segunda purificación se realizó en una columna de vidrio de 3.5 cm de diámetro empacada con gel de sílice a una altura de 20 cm y utilizando como fase móvil un gradiente de 0 a 5% de metanol en diclorometano (Figura 42). Con esta purificación se consiguió quitar una cantidad considerable del subproducto; sin embargo, la porfirina A_3B eluyó mezclada con la A_2B_2 . Cabe mencionar que para esta reacción, en la CCF las porfirinas A_2B_2 *cis* y *trans* aparecen como dos manchas diferentes; éste hecho produjo algo de confusión en un inicio, ya que al realizar la asignación del tipo de porfirina en base al R_f de S1 y THFP (ver anexo 1), se asignó erróneamente a la cuarta mancha como

la porfirina A_3B , posteriormente con los análisis de EM se comprobó que en realidad la cuarta mancha correspondía a la porfirina A_2B_2 y la quinta mancha a la A_3B (Figura 42 b).

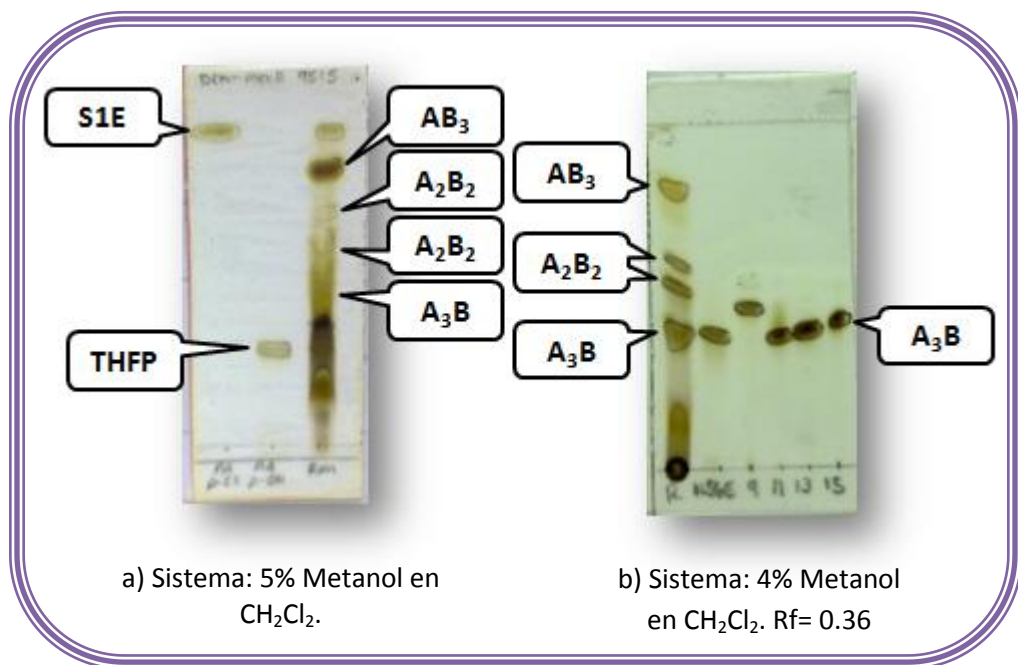


Figura 42. Cromatografía en capa fina de NS6E.

a) Comparación de las diferentes porfirinas obtenidas, b) fracciones colectadas con la porfirina A_3B pura.

La tercera purificación se realizó en una columna de vidrio de 2.4 cm de diámetro empacada con gel de sílice hasta una altura de 18 cm, empleando como fase móvil un gradiente de 0 a 4% de metanol en diclorometano; se colectaron 25 fracciones de 50 mL de color morado intenso, las cuales fueron monitoreadas con CCF.

La cuarta purificación se llevó a cabo para separar algunas fracciones que contenían porfirina A_2B_2 y la NS6E. Se utilizó una columna de vidrio de 1.5 cm

de diámetro empacada con gel de sílice a una altura de 25 cm, se obtuvieron 34 fracciones logrando separar la porfirina de interés.

Finalmente se juntaron todas las fracciones con el mismo factor de retención de la porfirina NS6E ($R_f = 0.36$) (Figura 42 b), se concentraron y se obtuvo un sólido de color morado.

5.6.3. RENDIMIENTO DE NS6E.

La porfirina NS6E posee una masa molecular de 697.18 g/mol y después de concluir con la purificación, se obtuvieron 143.4 mg lo cual corresponde a un 16.44% de rendimiento. Cabe señalar que este fue uno de los mayores rendimientos obtenidos, junto con la NS3E y NS4E.

5.6.4. CARACTERIZACIÓN DE NS6E.

5.6.4.1. ESPECTRO UV-VIS.

Se preparó una solución de porfirina (0.5 mg/mL en diclorometano) para poder determinar cualitativamente si el compuesto obtenido mostraba el patrón característico de las porfirinas. Se realizó la lectura en el espectrofotómetro UV-Vis y como muestra la Figura 43, se obtuvo el patrón característico de las

porfirinas. El máximo de la banda Soret se observó en 418 nm y las cuatro bandas Q aparecen en 517, 553, 593 y 649 nm.

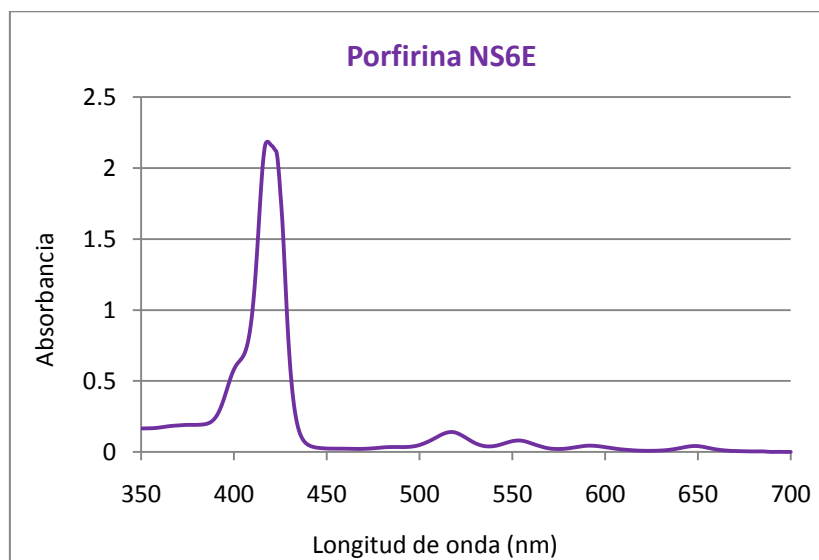
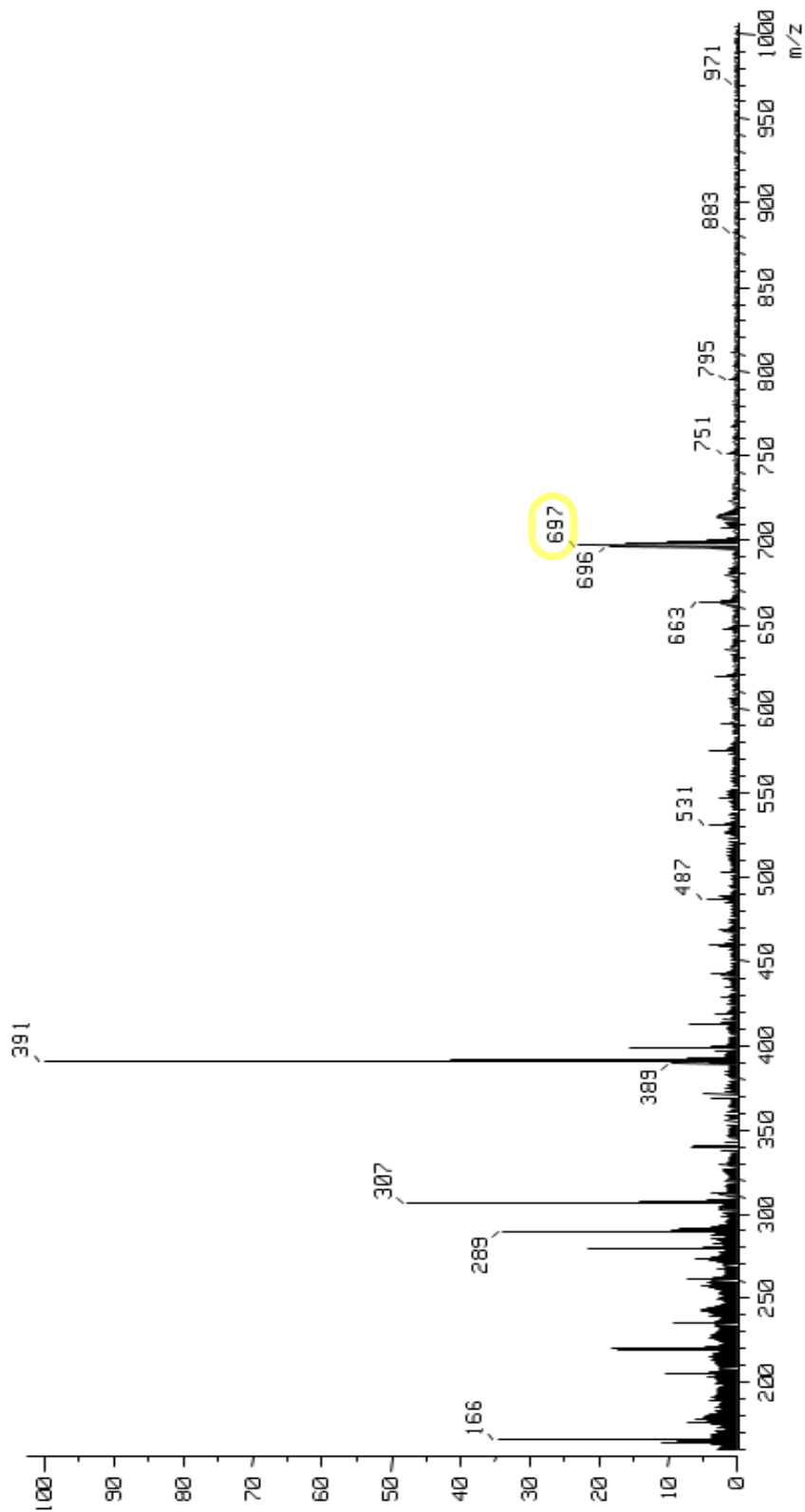


Figura 43. Espectro UV-Vis de la porfirina NS6E.

5.6.4.2. ESPECTRO RMN ^1H .

5.6.4.3. ESPECTRO MASAS.**Figura 44.** Espectro de masas de la porfirina NS6E.

El patrón de fragmentación (Figura 44) obtenido en el análisis de espectrometría de masas de baja resolución (FAB), mostró la relación masa/carga (m/z) del ion molecular. La masa molecular de la porfirina NS6E es de 697.18 g/mol y la relación masa/carga (m/z) del ion molecular M^+ fue de 697, por lo cual se puede afirmar que el compuesto sintetizado y purificado corresponde a la porfirina NS6E.

5.6.4.4. MASAS ALTA RESOLUCIÓN.

Seis tetraarilporfirinas no simétricas (NS1E, NS2E, NS3E, NS4E, NS5E, NS6E) fueron sintetizadas vía condensación de pirrol con una mezcla de aldehídos aromáticos con catálisis ácida y fueron purificadas por cromatografía en columna. Los datos obtenidos en cada análisis de caracterización, proporcionaron información fehaciente que permitió afirmar que la síntesis resultó efectiva para cada compuesto.

Las porfirinas NS1E, NS2E y NS5E presentaron dificultades para realizar su purificación, dando por consiguiente rendimientos bajos de compuesto puro (5.4%, 8.67% y 5.3% respectivamente). En la literatura se han reportado varios compuestos derivados de benzoporfirina que han mostrado resultados prometedores, algunos de estos se encuentran en Fase clínica III para el tratamiento de cáncer de piel (Vertiporfin) y en diversas etapas de evaluación clínica para el tratamiento de artritis reumatoide, psoriasis y esófago de Barrett. Aunque los resultados a la fecha son muy alentadores, también reportan que presentan la desventaja de una complicada separación y purificación de algunos de estos compuestos.²⁷

Las porfirinas NS3E, NS4E y NS6E presentaron menos dificultades para su purificación y fueron obtenidas con mayores rendimientos (21.14%, 15% y 16.44% respectivamente). Si bien los rendimientos no resultan altos para la síntesis de compuestos orgánicos en general, éstos se encuentran dentro de los reportados en la bibliografía.³³ Además se consideró lo descrito en la literatura, la cual muestra que

solamente es requerida una pequeña cantidad de compuesto para realización de las pruebas biológicas, es decir que las IC50 para algunos compuestos porfirínicos se encuentra en el rango de ng/mL.^{19,33}

B. FOTODEGRADACIÓN.

En base a la importancia del estudio del comportamiento en presencia de luz visible de los compuestos considerados como potenciales fotosensibilizadores, se realizaron diversos experimentos tanto de la porfirina A₄ derivada de *p*-clorobenzaldehído (S1E), como de algunas de las porfirinas A₃B.

5.7. FOTODEGRADACIÓN CON LÁMPARA DE HALÓGENO-TUNGSTENO DE 500 W.

5.7.1. Porfirina simétrica A₄ de *p*-clorofenilo (S1E).

Se fotodegradó la porfirina A₄ con una lámpara halógeno incandescente de 500W, ésta se colocó aproximadamente a 30cm de la muestra y con un filtro de agua, se monitoreó el patrón de fotodegradación con un espectrofotómetro UV-Vis para un máximo de tiempo de exposición de 4h y usando una muestra de 5x10⁻⁵ g/mL se obtuvo el patrón de fotodegradación que se muestra en la Figura 45. En este experimento se observó que a las 4 horas la banda Soret disminuyó considerablemente. Las bandas Q desaparecen totalmente en el espectro y

finalmente es observable a simple vista un cambio de coloración de la muestra de rosa claro a amarillo pálido, lo cual sugiere, de acuerdo a lo reportado,²⁹ que podría estar presente un “photobleaching” verdadero. Para observar más claramente esta diferencia, se muestra la gráfica X en donde se observa la relación entre la diferencia de absorbancia (final – inicial) y la longitud de onda.

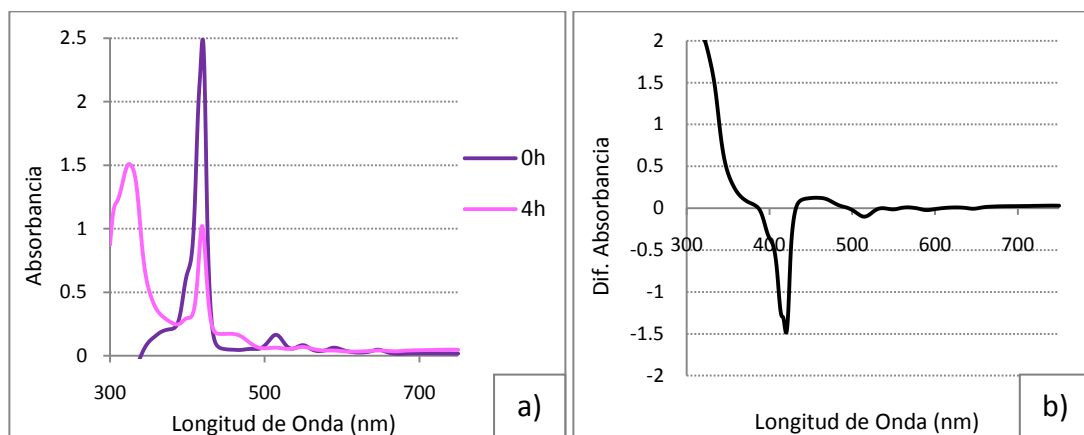


Figura 45. (a) Espectro de absorción de la porfirina A₄ (*p*-Clorofenilo) antes y después de la irradiación con lámpara de HAL-TU (500W) (b) Gráfica de diferencia de absorbancia (irradiada menos no irradiada)

5.7.2. Porfirinas no simétrica A₃B.

Las porfirinas A₃B se sometieron a irradiación de la misma manera que la porfirina A₄ (*p*-Clorofenilo), observando que el patrón de fotodegradación de estas porfirinas no simétricas es similar al de la porfirina simétrica, específicamente, la porfirina NS3E fue la que presentó mayor similitud, observando claramente la disminución en la banda Soret a 418nm. Además de la aparición de bandas de absorción en la región del UV posiblemente por la formación de otros fotoproductos, como se puede observar en la Figura 46 tal

como se ha reportado para compuestos tetrapirrólicos similares, para los cuales se han aislado y caracterizado fotoproductos con λ_{\max} entre 240 y 320 nm, tales como mono- o di-pirroles.⁴¹

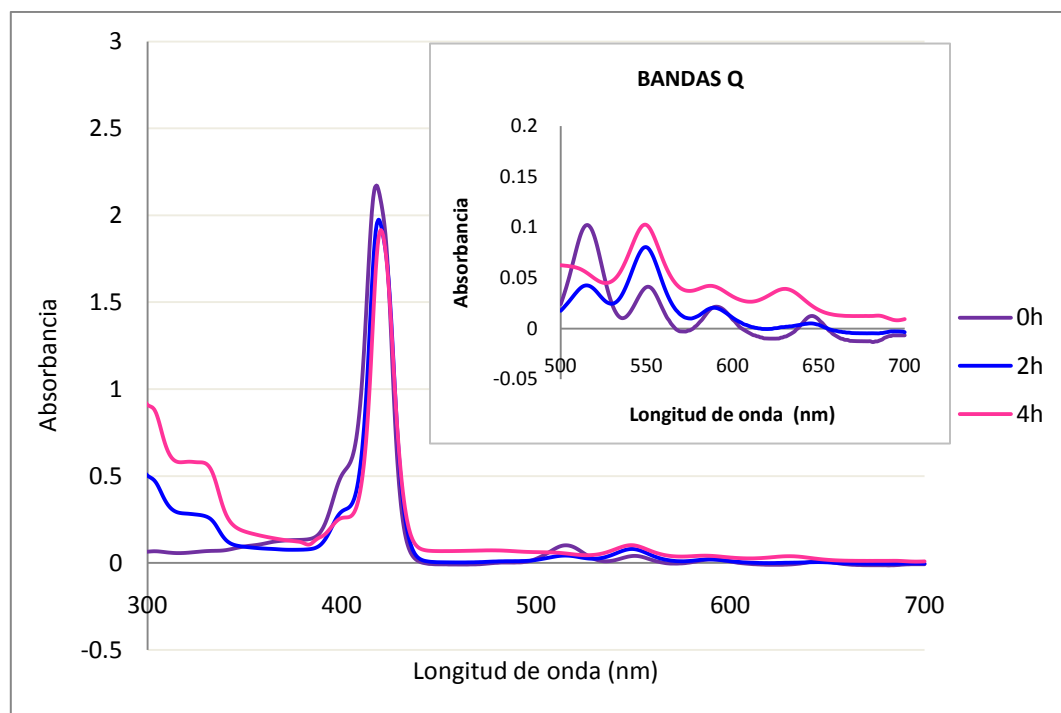


Figura 46. Fotodegradación de porfirina A₃B, NS3E, (5×10^{-6} g/mL).

Además, en la región correspondiente a las bandas Q, se observa una banda nueva entre 629 y 631 nm a las 4 horas de irradiación, aproximadamente en esta región se ha reportado una banda característica de estructuras tipo clorina o bacterioclorina,³¹ cuya estructura difiere con la del macrociclo de la porfirina en la presencia de enlaces saturados entre los carbonos 2-3 (clorina) o 7-8 y 17-18 (bacterioclorina) de los anillos de pirrol (Esquema 1).

El patrón se repitió para el resto de las porfirinas A₃B analizadas. Para comparar todas las porfirinas estudiadas se analizaron los resultados a 2h y 4h de irradiación ya que son los tiempos a los cuales se observaron cambios significativos en general, se muestran las gráficas en las que se observa la relación entre la diferencia de absorbancia (absorbancia final menos inicial) y la longitud de onda.

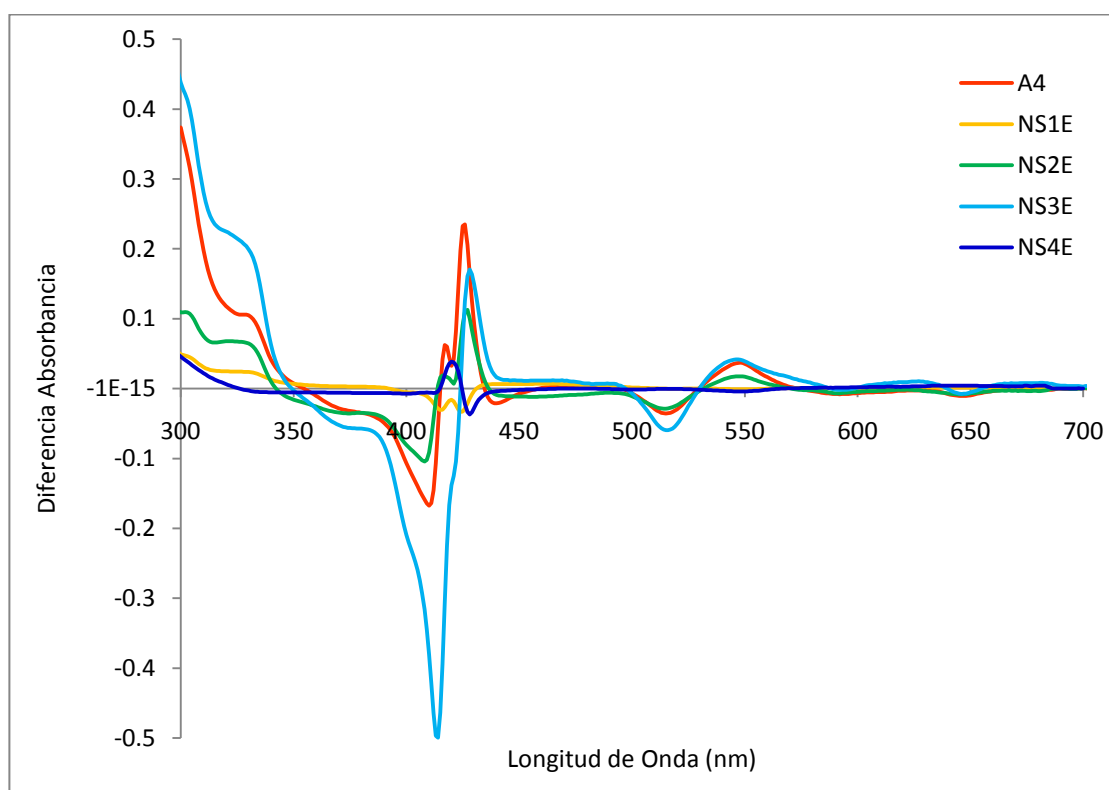


Figura 47. Gráfica comparativa de diferencia absorbancia a 2 h de irradiación.

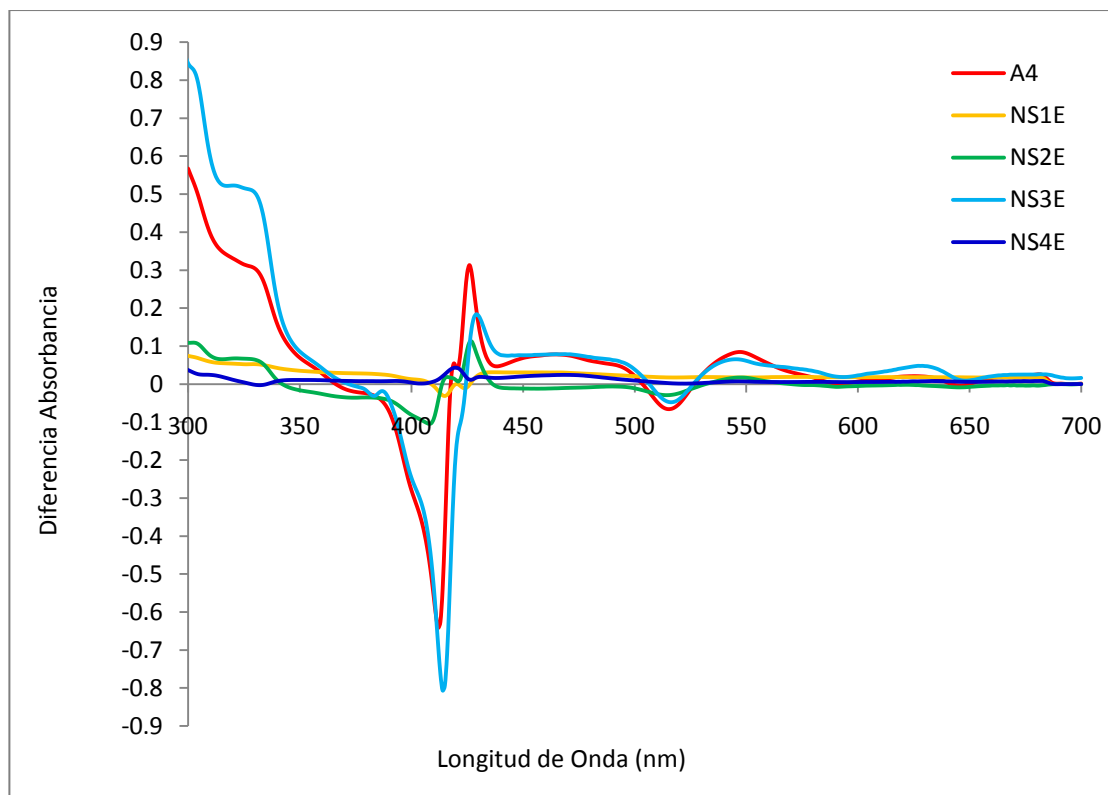


Figura 48. Gráfica comparativa de diferencia de absorbancia a 4 h de irradiación.

Las Figura 47 y Figura 48 muestran las variaciones tanto a 2h como a 4h, para todas las porfirinas estudiadas, siendo las que más tuvieron diferencia la A₄ y la NS3E, sugiriendo la influencia de los grupos sustituyentes de los fenilos en *meso*, en el patrón de fotodegradación de las tetraarilporfirinas a diferentes tiempos de irradiación con luz visible, sin embargo, los resultados no son concluyentes en relación a este aspecto.

Al finalizar estos experimentos y debido a la similitud en las variaciones de absorbancia después de irradiar las diferentes porfirinas estudiadas, se decidió continuar con los experimentos que se describen en las siguientes secciones únicamente analizando la porfirina A₄ derivada de *p*-clorobenzaldehído, obteniendo resultados interesantes que permitieron corroborar el comportamiento de este tipo de compuestos en presencia de luz.

5.7.3. Prueba de irreversibilidad de la fotodegradación.

Para corroborar que la fotodegradación de las porfirinas no es reversible, se observaron las muestras que fueron analizadas previamente e irradiadas por 4 h; después de 24 y 48 h de haber concluido la irradiación se determinó el espectro de absorción UV-Vis. Los resultados se muestran en la Figura 49, en donde se puede observar que el patrón de la porfirina A₄ continúa sin modificación a través del tiempo en que se realizó el análisis.

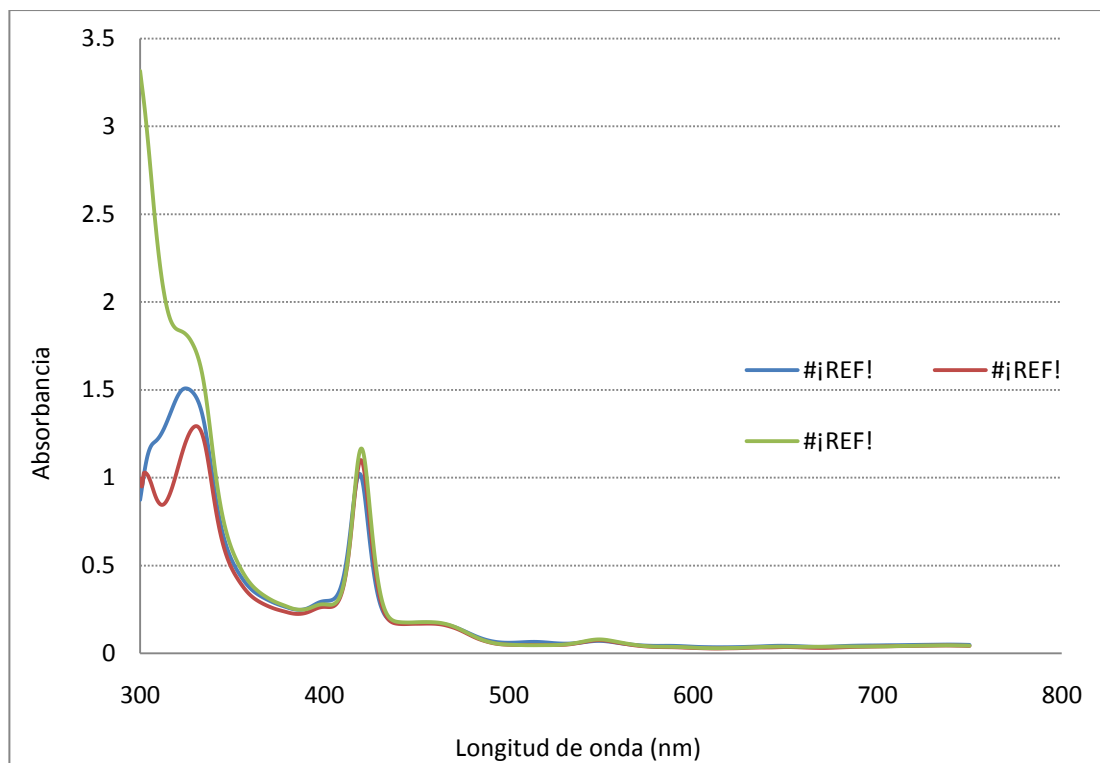


Figura 49. Espectro de absorción de la porfirina A₄ después de 24h y 48h de la irradiación por 4h con lámpara de HAL-TU de 500W.

5.8. FOTODEGRADACIÓN CON LÁMPARA DE LEDs.

5.8.1. Fotodegradación con lámpara LED 10 W.

El experimento que se llevó a cabo utilizando una lámpara de LED de 10 W, mostró los resultados que se observan en la Figura 6, en donde es clara una disminución de la absorbancia de la banda Soret a medida que aumenta el tiempo de exposición. Además, las bandas Q (IV, II y I) correspondientes reflejan una evidente disminución, desde las 2 horas, además de un aumento en la banda Q (III). Finalmente, a las 6 horas de irradiación se observa la disminución

casi total de las cuatro bandas Q. Es importante señalar que en este experimento la coloración de la muestra cambia de rosa a amarillo pálido, lo cual refleja un cambio ya sea en la estructura del macrociclo (fotomodificación) o bien la ruptura del mismo y la formación fotoproductos (“photobleaching” verdadero).

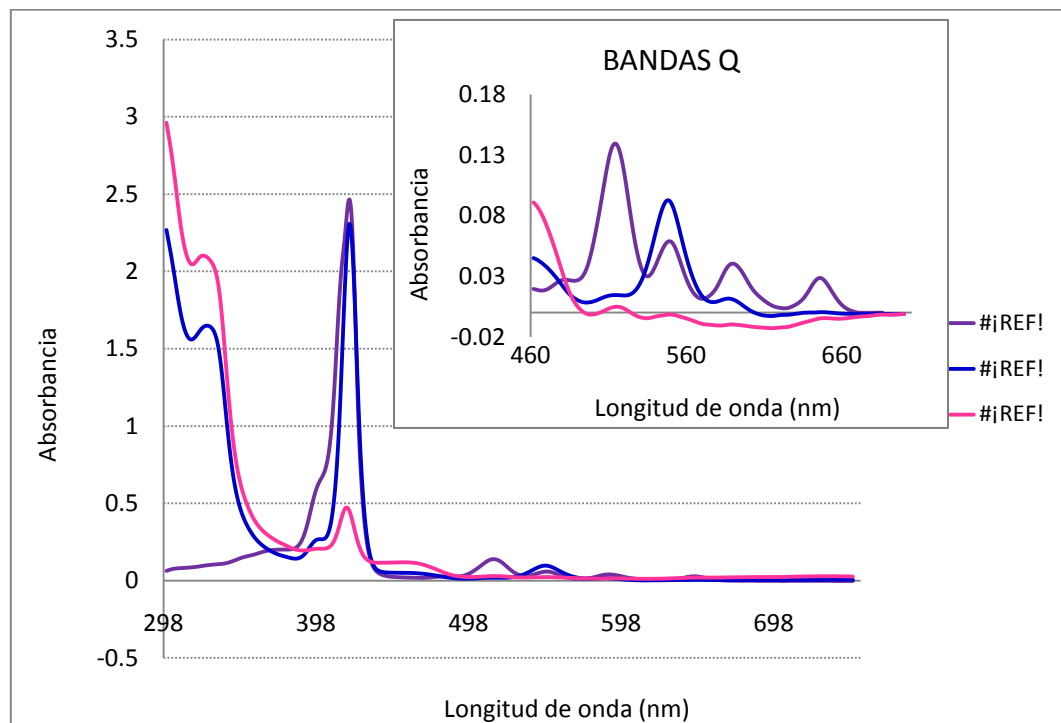


Figura 50. Fotodegradación de porfirina A_4 con lámpara de LED de 10W.

5.8.2. Fotodegradación con lámpara LED 35 W.

En base a lo observado en el experimento donde se utilizó una lámpara de LED 10W, se decidió realizar un nuevo experimento utilizando una de LED 35W, los resultados se muestran en la Figura 51 en la cual es clara la disminución de la banda Soret a medida que aumenta el tiempo de irradiación, lo cual implica la

modificación en la estructura del macrociclo de manera similar a lo observado en los experimentos anteriores.

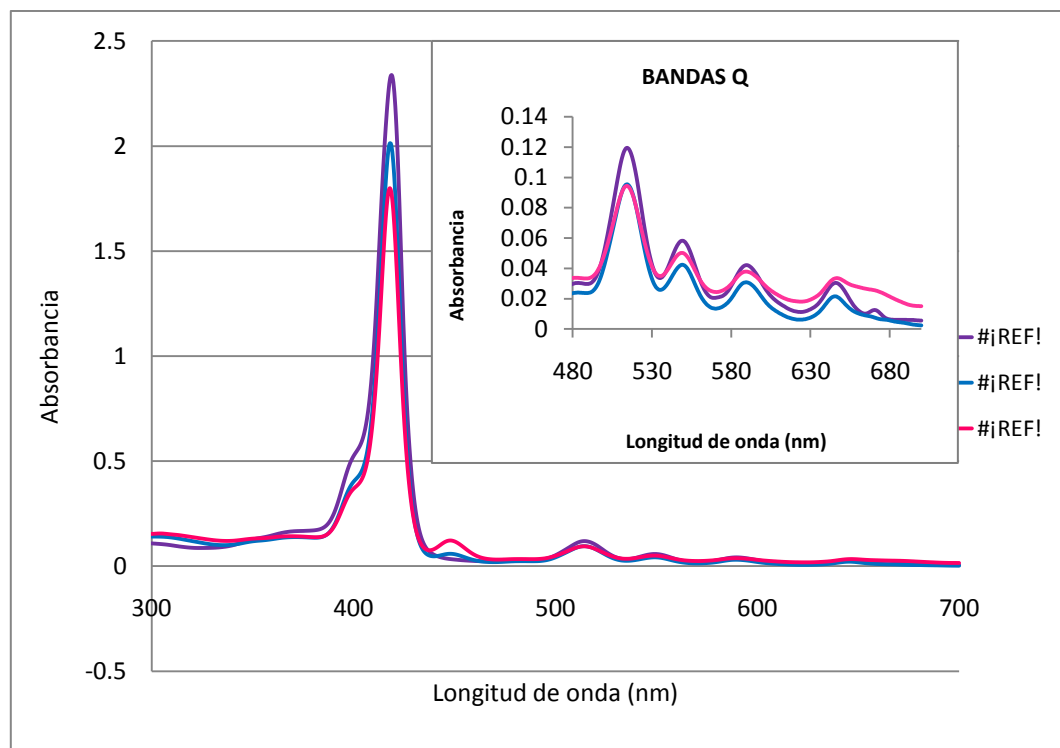
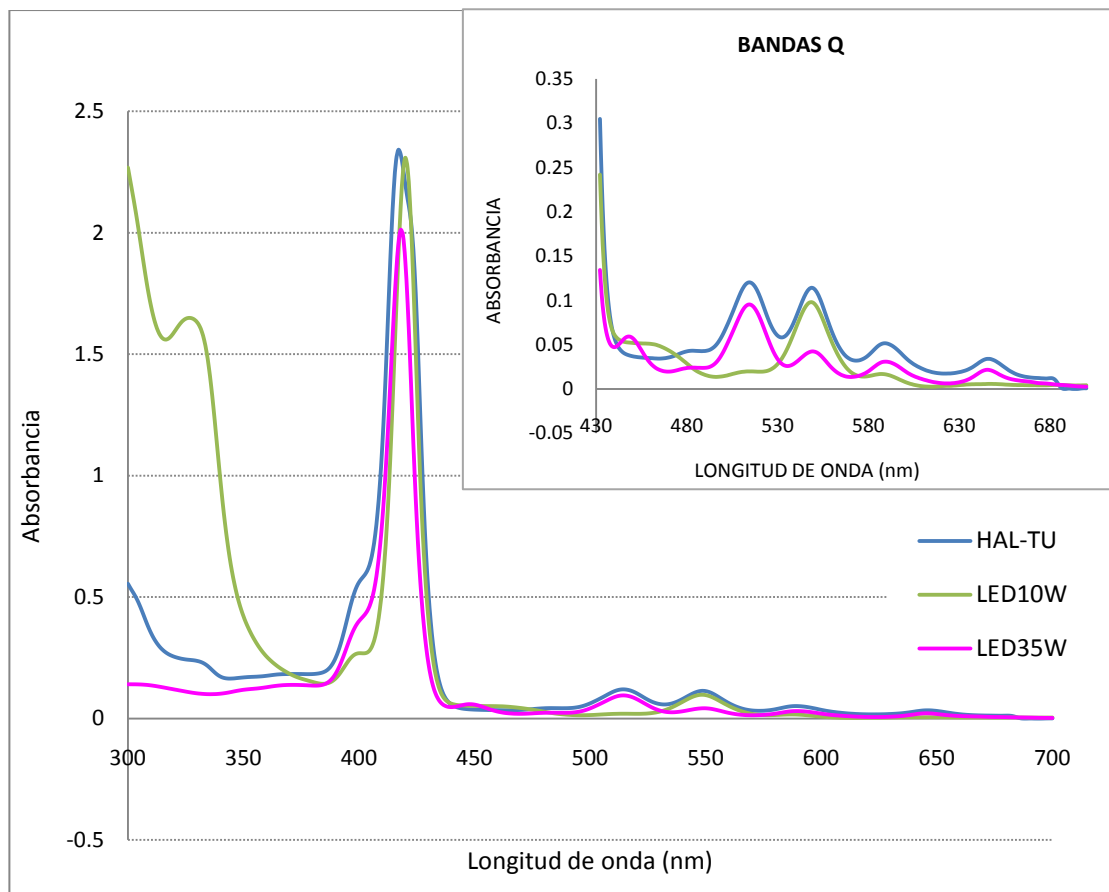


Figura 51. Fotodegradación de porfirina A₄ con lámpara de LED de 35W.

Una vez finalizados los experimentos que se describen en esta sección se llegó a la conclusión que un tiempo de irradiación de 2 horas tal como lo marca el protocolo para las pruebas de citotoxicidad *in vitro* es un tiempo adecuado en el cual es posible observar un patrón de fotodegradación que permite medir el efecto citotóxico y antecancerígeno *in vitro* de cada una de las porfirinas sintetizadas, es importante señalar, que si bien la concentración que se utilizó para las pruebas de fotodegradación descritas fue de 5×10^{-5} g/mL (debido a la facilidad de observación

de las señales de las porfirinas en UV-Vis), la concentración que se utilizará en las pruebas biológicas será mucho menor, por lo tanto es posible sugerir que si a esta concentración (relativamente alta) se observó fotodegradación en general de las porfirinas, a una concentración menor y con la misma eficiencia luminosa incidida (la correspondiente a la lámpara de LEDs de 35W) sobre las células en estudio, es posible medir la actividad biológica de las mismas de manera adecuada. Es importante señalar que con la lámpara de Halógeno-Tungsteno se observa el patrón de fotodegradación de las porfirinas; sin embargo, el incremento que se observó en la temperatura de las muestras estudiadas (hasta 40-50°C) no es adecuado para su uso como fuente de luz en los estudios *in vitro* ya que las células son sensibles a la temperatura. Si bien con la lámpara de LEDs de 10W se observa también la fotodegradación de los compuestos, se decidió utilizar la de LEDs de 35W por las siguientes razones:

- a) No se presenta un incremento en la temperatura (se mantiene alrededor de 30°C).
- b) Al observar la Figura 52, en general y específicamente en la región de las bandas Q, se sugiere una mayor similitud entre el patrón observado en los experimentos de HAL-TU y el de LED 35W que entre HAL-TU y LED 10W.
- c) Se observa una mayor disminución de la banda Soret en el caso del experimento con LED 35W.



C. PRUEBAS BIOLÓGICAS.**5.9. ENSAYOS DE ACTIVIDAD CITOTÓXICA.**

Las porfirinas NS1E – NS6E fueron evaluadas en células VERO, HeLa y MCF7 como se describió en la parte de metodología (apartado 4.5.2). Después de realizar dos lecturas de la placa de 96 pozos (Figura 13 y Figura 14), se obtuvieron 6 valores de cada concentración analizada; se calcularon media, desviación estándar y se realizó la curva de “Absorbancia vs tiempo”.

La ecuación de la recta fue calculada con los controles de 100% de viabilidad (células + medio de cultivo) y 0% de viabilidad (células + tritón) y se utilizó para calcular el porcentaje de viabilidad correspondiente a cada concentración evaluada. Una vez obtenido el % de viabilidad, se realizó la curva “% Viabilidad vs Concentración” y por medio de una interpolación se determinó la IC50 para cada compuesto.

5.9.1. CITOTOXICIDAD DE NS1E.**5.9.1.1. CITOTOXICIDAD DE NS1E EN CÉLULAS HeLa.**

Los valores de absorbancia media y desviación estándar obtenidos para cada concentración evaluada de NS1E, se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Resultados de citotoxicidad de NS1E en células HeLa.

CONCENTRACIÓN (µg/mL)	Absorbancia media	Desviación estándar
0.1	3.0437	0.0556
1	3.0697	0.1360
10	2.8538	0.1378
50	1.9372	0.0740
100	0.0495	0.0229
Control +	3.1922	0.0491
Control -	0.0113	0.0047

La ecuación de la recta obtenida que se utilizó para la determinación del % de viabilidad fue $y = 30.189x - 0.3421$.

Empleando la ecuación de la recta, se calculó el porcentaje de viabilidad correspondiente a cada concentración evaluada (Tabla 16).

Tabla 16. Porcentaje de viabilidad de NS1E en células HeLa.

CONCENTRACIÓN (µg/mL)	% Viabilidad
0	100.0
0.1	91.5
1	92.3
10	85.8
50	58.1
100	1.2

Los porcentajes de viabilidad obtenidos se utilizaron para trazar la curva mostrada en la Figura 53. La IC₅₀ determinada para la porfirina NS1E en células HeLa es de 57.5 µg/mL

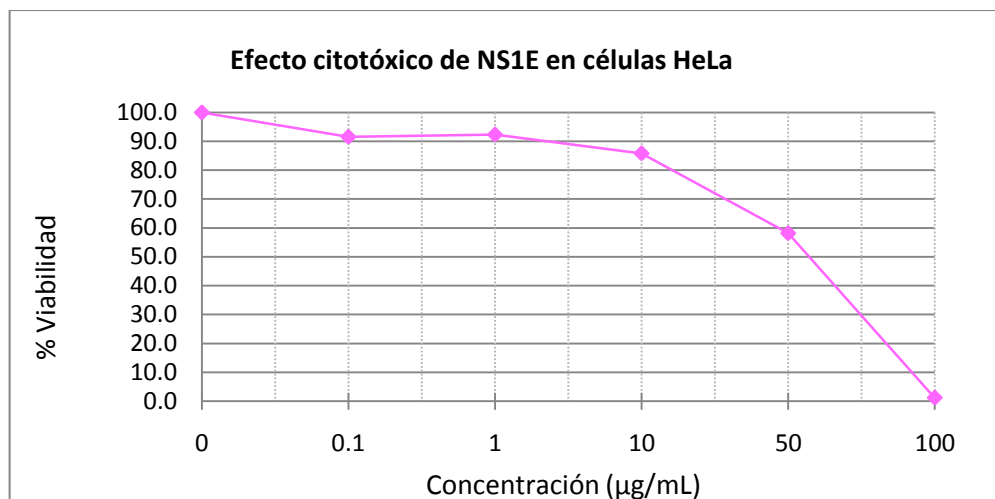


Figura 53. Efecto citotóxico de NS1E en células HeLa.

5.9.1.2. CITOTOXICIDAD DE NS1E EN CÉLULAS MCF7.

Los valores de absorbancia media y desviación estándar obtenidos para la porfirina NS1E en células MCF7, se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Resultados de citotoxicidad de NS1E en células MCF7.

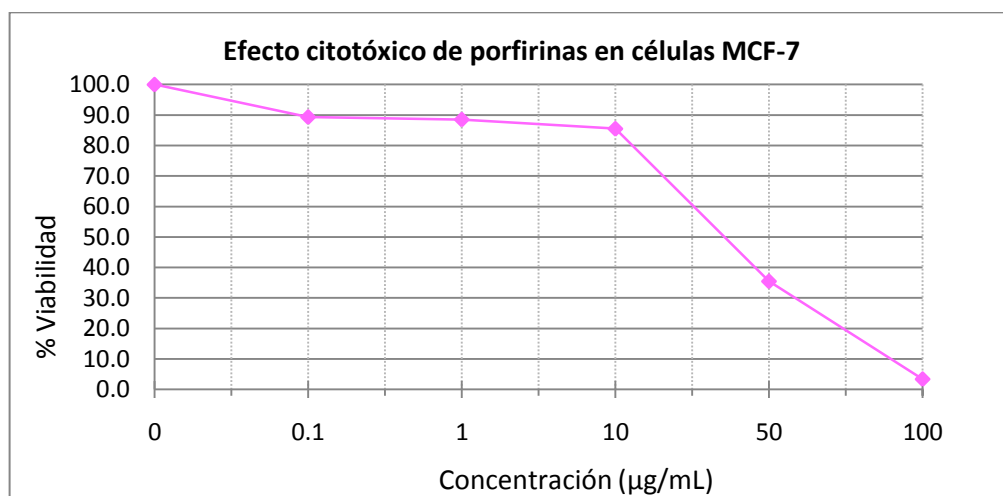
CONCENTRACIÓN (µg/mL)	Absorbancia media	Desviación estándar
0.1	0.7363	0.0198
1	0.7295	0.0485
10	0.7047	0.0758
50	0.2922	0.0208
100	0.0277	0.0024
Control +	0.8240	0.0248
Control -	0	0.0080

La ecuación de la recta calculada fue: $y = 121.36x$, con esta ecuación se calculó el porcentaje de viabilidad correspondiente a cada concentración evaluada (Tabla 18).

Tabla 18. Porcentaje de viabilidad de NS1E en células MCF7.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% Viabilidad
0	100
0.1	89.4
1	88.5
10	85.5
50	35.5
100	3.4

Los porcentajes de viabilidad obtenidos se utilizaron para trazar la curva mostrada en la Figura 54. La IC₅₀ determinada para la porfirina NS1E en células MCF7 es de 38 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

**Figura 54.** Efecto citotóxico de NS1E en células MCF7.

5.9.2. CITOTOXICIDAD DE NS2E.

5.9.2.1. CITOTOXICIDAD DE NS2E EN CÉLULAS HeLa.

Los valores de absorbancia media y desviación estándar obtenidos para cada concentración de NS2E en células HeLa, se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Resultados de citotoxicidad de NS2E en células HeLa.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Absorbancia media	Desviación estándar
0.1	2.7740	0.1330
1	2.5120	0.0796
10	1.8395	0.0620
50	1.5725	0.0384
100	0.0532	0.0114
Control +	3.1922	0.0491
Control -	0.0113	0.0047

La ecuación de la recta que se utilizó para determinar el % de viabilidad fue $y = 30.189x - 0.3421$, con esta ecuación se calculó el porcentaje de viabilidad correspondiente a cada concentración de NS2E (Tabla 20).

Tabla 20. Porcentaje de viabilidad de NS2E en células HeLa.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% Viabilidad
0	100
0.1	83.4
1	75.5
10	55.2
50	47.1
100	1.3

Los porcentajes de viabilidad obtenidos se utilizaron para trazar la curva mostrada en la Figura 55. La IC₅₀ determinada para la porfirina NS2E en células HeLa es de 37 $\mu\text{g}/\text{mL}$

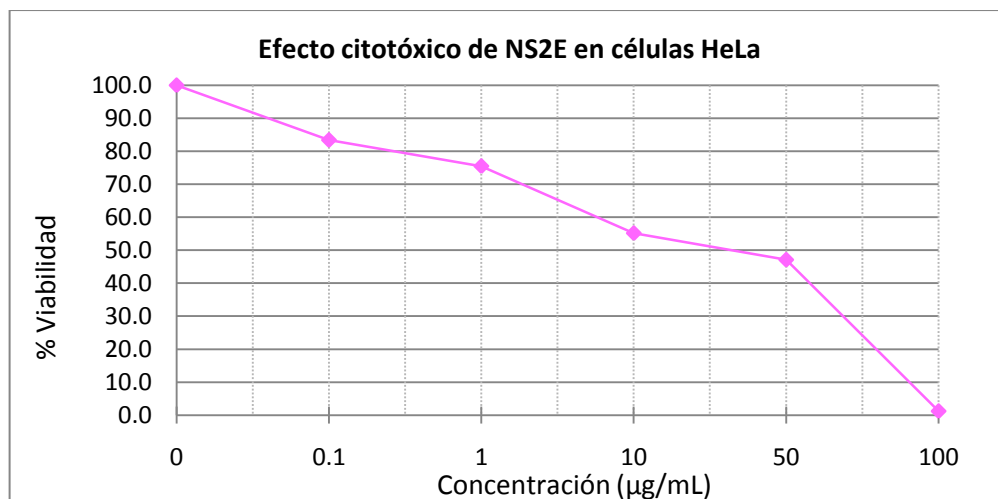


Figura 55. Efecto citotóxico de NS2E en células HeLa.

5.9.2.2. CITOTOXICIDAD DE NS2E EN CÉLULAS MCF7.

Los valores de absorbancia media y desviación estándar obtenidos para la porfirina NS2E en células MCF7, se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21. Resultados de citotoxicidad de NS2E en células MCF7.

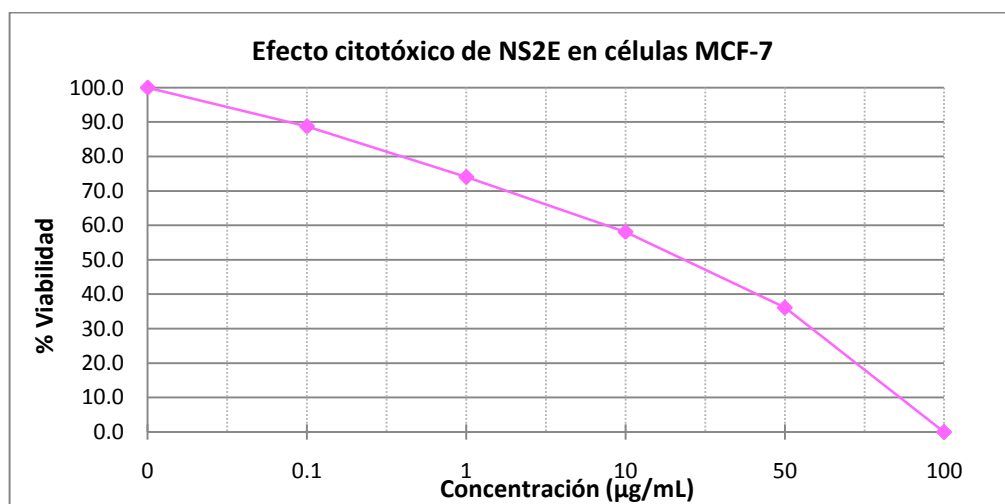
CONCENTRACIÓN (µg/mL)	Absorbancia media	Desviación estándar
0.1	0.6203	0.0196
1	0.5192	0.0135
10	0.4093	0.0577
50	0.2578	0.0413
100	0.0048	0.0039
Control +	0.6978	0.0139
Control -	0.0092	0.0034

La ecuación de la recta que se utilizó para determinar el % de viabilidad fue $y = 145.21x - 1.3311$, con la cual se calculó el porcentaje de viabilidad correspondiente a cada concentración de NS2E (Tabla 22).

Tabla 22. Porcentaje de viabilidad de NS2E en células MCF7.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% Viabilidad
0	100
0.1	88.7
1	74.1
10	58.1
50	36.1
100	0

Los porcentajes de viabilidad obtenidos se utilizaron para trazar la curva mostrada en la Figura 55. La IC_{50} determinada para la porfirina NS2E en células MCF7 es de $25 \mu\text{g}/\text{mL}$.

**Figura 56.** Efecto citotóxico de NS2E en células HeLa.

5.9.3. CITOTOXICIDAD DE NS3E.

5.9.3.1. CITOTOXICIDAD DE NS3E EN CÉLULAS HeLa.

En la Tabla 23 se muestran los valores de absorbancia media y desviación estándar correspondientes a cada concentración de NS3E probada en células HeLa.

Tabla 23. Resultados de citotoxicidad de NS3E en células HeLa.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Absorbancia media	Desviación estándar
0.1	2.9918	0.1068
1	2.9317	0.2376
10	2.8640	0.2469
50	2.4013	0.0778
100	0.3397	0.0682
Control +	3.1922	0.0491
Control -	0.113	0.0047

La ecuación de la recta que se utilizó para determinar el % de viabilidad fue $y = 30.189x - 0.3421$, con esta ecuación se calculó el porcentaje de viabilidad correspondiente a cada concentración de NS3E (Tabla 24).

Tabla 24. Porcentaje de viabilidad de NS3E en células HeLa.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% Viabilidad
0	100
0.1	90
1	88.2
10	86.1
50	72.2
100	9.9

Los porcentajes de viabilidad obtenidos se utilizaron para trazar la curva mostrada en la Figura 57. La IC₅₀ determinada para la porfirina NS3E en células HeLa es de 68 µg/mL.

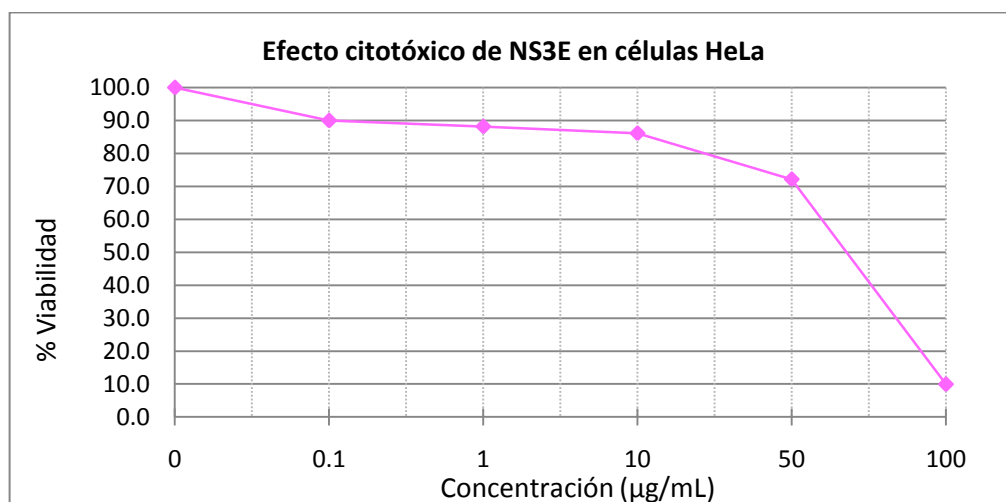


Figura 57. Efecto citotóxico de NS3E en células HeLa.

5.9.3.2. CITOTOXICIDAD DE NS3E EN CÉLULAS MCF7.

Los valores de absorbancia media y desviación estándar obtenidos para la porfirina NS3E en células MCF7, se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25. Resultados de citotoxicidad de NS3E en células MCF7.

CONCENTRACIÓN (µg/mL)	Absorbancia media	Desviación estándar
0.1	0.6232	0.0130
1	0.5827	0.0615
10	0.5012	0.0660
50	0.2242	0.0106
100	0.0828	0.0036
Control +	0.6978	0.0139
Control -	0.0092	0.0034

Utilizando los resultados de los controles, se obtuvo la ecuación de la recta ($y = 145.21x - 1.3311$), la cual fue de utilidad para determinar el % de viabilidad correspondiente a cada concentración de NS3E (Tabla 26).

Tabla 26. Porcentaje de viabilidad de NS3E en células MCF7.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	% Viabilidad
0	100
0.1	89.2
1	83.3
10	71.4
50	31.2
100	10.7

Los porcentajes de viabilidad obtenidos se utilizaron para trazar la curva mostrada en la Figura 58. La IC50 determinada para la porfirina NS3E en células MCF7 es de 32 $\mu\text{g/mL}$.

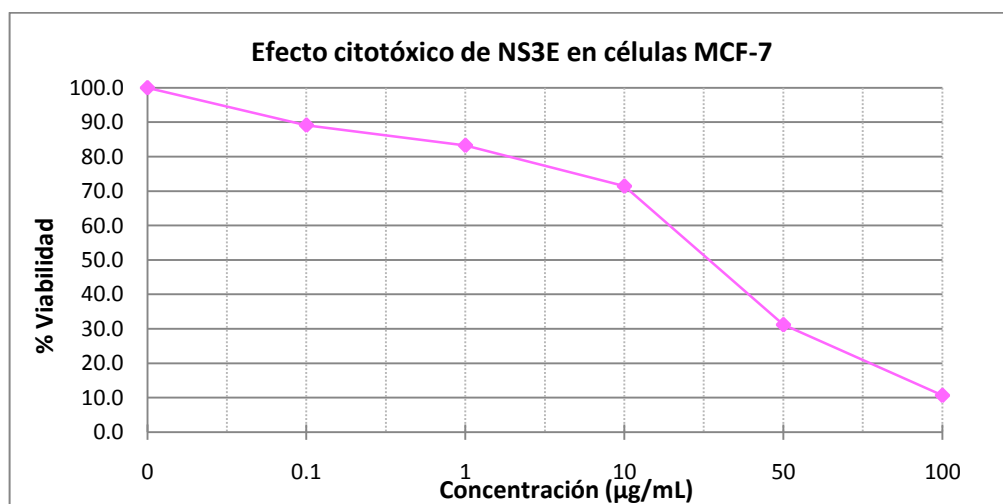


Figura 58. Efecto citotóxico de NS3E en células MCF7.

5.9.4. CITOTOXICIDAD DE NS4E.

5.9.4.1. CITOTOXICIDAD DE NS4E EN CÉLULAS HeLa.

Los valores de absorbancia media y desviación estándar correspondientes a la porfirina NS4E, se muestra en la Tabla 27.

Tabla 27. Resultados de citotoxicidad de NS4E en células HeLa.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Absorbancia media	Desviación estándar
0.1	0.9048	0.0120
1	0.8267	0.0282
10	0.5770	0.0057
50	0.4260	0.0135
100	0.2787	0.0086
Control +	0.9718	0.0065
Control -	0.0097	0.00259

La ecuación de la recta que se utilizó para determinar el % de viabilidad fue $y = 103.94x - 1.0082$, con esta ecuación se calculó el porcentaje de viabilidad correspondiente a cada concentración de NS4E (Tabla 28).

Tabla 28. Porcentaje de viabilidad de NS4E en células HeLa.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% Viabilidad
0	100
0.1	93
1	84.9
10	59
50	43.3
100	28

Los porcentajes de viabilidad obtenidos se utilizaron para trazar la curva mostrada en la Figura 59. La IC₅₀ determinada para la porfirina NS4E en células HeLa es de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

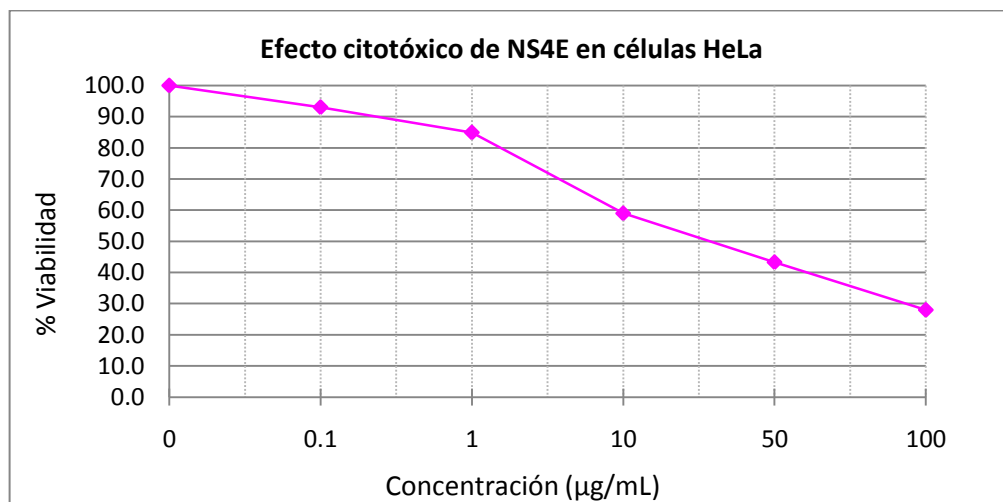


Figura 59. Efecto citotóxico de NS4E en células HeLa.

5.9.4.2. CITOTOXICIDAD DE NS4E EN CÉLULAS MCF7.

Los valores de absorbancia media y desviación estándar obtenidos para la porfirina NS4E en células MCF7, se muestran en la Tabla 29.

Tabla 29. Resultados de citotoxicidad de NS4E en células MCF7.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Absorbancia media	Desviación estándar
0.1	0.3793	0.0044
1	0.3455	0.0138
10	0.0883	0.0163
50	0.0243	0.0042
100	0.0035	0.0008
Control +	0.3905	0.0147
Control -	0.0114	0.0053

Utilizando los resultados de los controles, se obtuvo la ecuación de la recta ($y = 263.76x - 2.9981$), la cual fue de utilidad para determinar el % de viabilidad correspondiente a cada concentración de NS4E (Tabla 30).

Tabla 30. Porcentaje de viabilidad de NS4E en células MCF7.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% Viabilidad
0	100
0.1	97.1
1	88.1
10	20.3
50	3.4
100	0

Los porcentajes de viabilidad obtenidos se utilizaron para trazar la curva mostrada en la Figura 58. La IC₅₀ determinada para la porfirina NS4E en células MCF7 es de 9.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

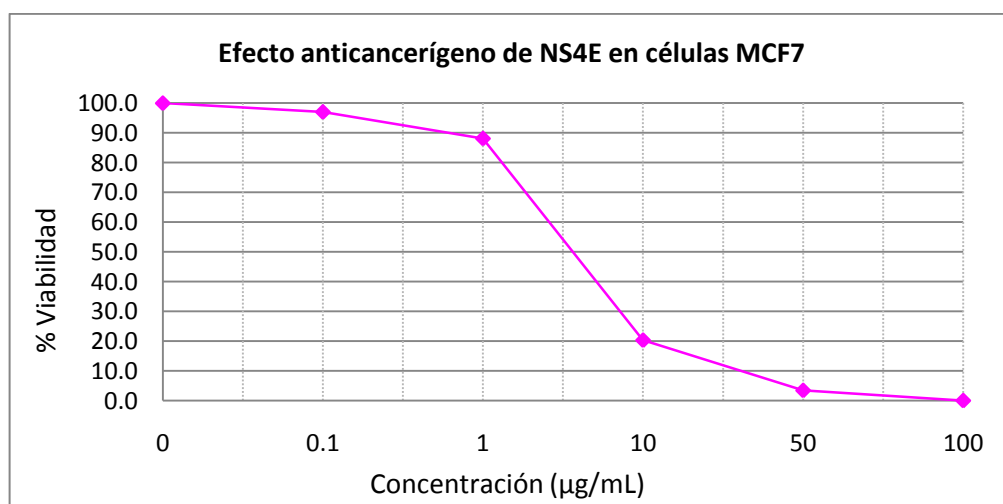


Figura 60. Efecto citotóxico de NS4E en células MCF7.

5.9.5. CITOTOXICIDAD DE NS5E.

5.9.5.1. CITOTOXICIDAD DE NS5E EN CÉLULAS HeLa.

La Tabla 31, muestra los valores de absorbancia media y desviación estándar de la porfirina NS5E en células HeLa.

Tabla 31. Resultados de citotoxicidad de NS5E en células HeLa.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Absorbancia media	Desviación estándar
0.1	2.3487	0.0406
1	2.0365	0.1731
10	1.9718	0.0204
50	1.4650	0.0488
100	0.0403	0.0095
Control +	3.1922	0.0491
Control -	0.0113	0.0047

La ecuación de la recta que se utilizó para determinar el % de viabilidad fue $y = 30.189x - 0.3421$, con esta ecuación se calculó el porcentaje de viabilidad correspondiente a cada concentración de NS5E (Tabla 32).

Tabla 32. Porcentaje de viabilidad de NS5E en células HeLa.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% Viabilidad
0	100
0.1	70.6
1	61.1
10	59.2
50	43.9
100	0.9

Los porcentajes de viabilidad obtenidos se utilizaron para trazar la curva mostrada en la Figura 61. La IC₅₀ determinada para la porfirina NS5E en células HeLa es de 32.5 µg/mL.

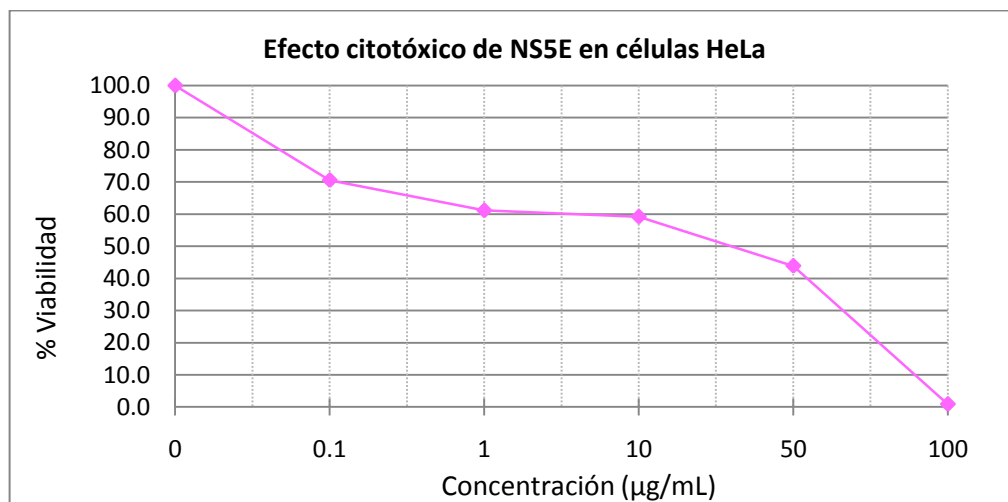


Figura 61. Efecto citotóxico de NS5E en células HeLa.

5.9.5.2. CITOTOXICIDAD DE NS5E EN CÉLULAS MCF7.

Los valores de absorbancia media y desviación estándar obtenidos para la porfirina NS5E en células MCF7, se muestran en la Tabla 33.

Tabla 33. Resultados de citotoxicidad de NS5E en células MCF7.

CONCENTRACIÓN (µg/mL)	Absorbancia media	Desviación estándar
0.1	0.5163	0.0231
1	0.4805	0.0349
10	0.4485	0.0397
50	0.2435	0.0186
100	0.0142	0.0032
Control +	0.6978	0.0139
Control -	0.0092	0.0034

Utilizando los resultados de los controles, se obtuvo la ecuación de la recta ($y = 145.21x - 1.3311$), la cual fue de utilidad para determinar el % de viabilidad correspondiente a cada concentración de NS5E (Tabla 34).

Tabla 34. Porcentaje de viabilidad de NS5E en células MCF7.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	% Viabilidad
0	100
0.1	73.6
1	68.4
10	63.8
50	34
100	0.7

Los porcentajes de viabilidad obtenidos se utilizaron para trazar la curva mostrada en la Figura 62. La IC₅₀ determinada para la porfirina NS5E en células MCF7 es de 29 $\mu\text{g/mL}$.

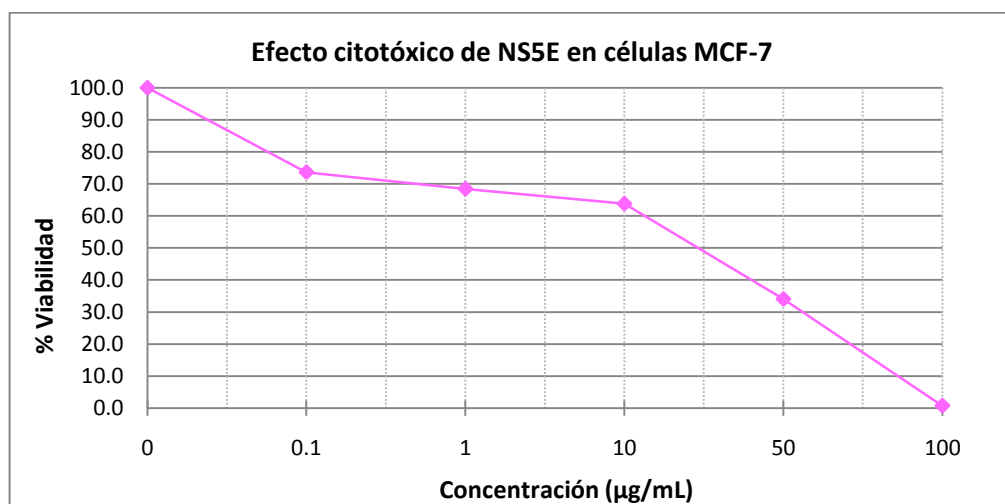


Figura 62. Efecto citotóxico de NS5E en células MCF7.

5.9.6. CITOTOXICIDAD DE NS6E.**5.9.6.1. CITOTOXICIDAD DE NS6E EN CÉLULAS HeLa.**

La Tabla 35 muestra los valores de absorbancia media y desviación estándar de la porfirina NS6E en células HeLa.

Tabla 35. Resultados de citotoxicidad de NS6E en células HeLa.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Absorbancia media	Desviación estándar
0.1	0.4800	0.0028
1	0.4158	0.0050
10	0.2910	0.0074
50	0.0712	0.0078
100	0.300	0.0030
Control +	0.9718	0.0065
Control -	0.0097	0.0059

La ecuación de la recta que se utilizó para determinar el % de viabilidad fue $y = 103.94x - 1.0082$, con esta ecuación se calculó el porcentaje de viabilidad correspondiente a cada concentración de NS6E (Tabla 36).

Tabla 36. Porcentaje de viabilidad obtenido de NS6E en células HeLa.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% Viabilidad
0	100
0.1	48.9
1	42.2
10	29.2
50	6.4
100	2.1

Los porcentajes de viabilidad obtenidos se utilizaron para trazar la curva mostrada en la Figura 63. La IC50 determinada para la porfirina NS6E en células HeLa es de 0.098 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

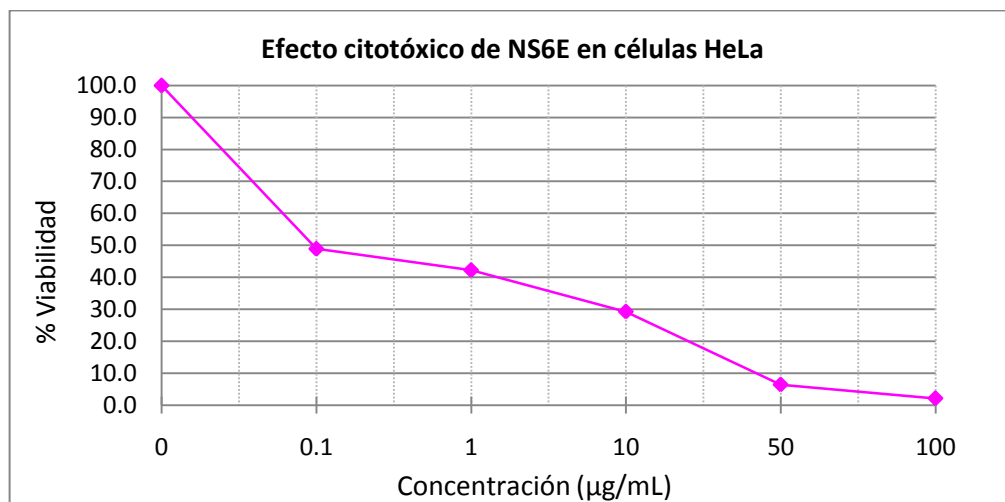


Figura 63. Efecto citotóxico de NS6E en células HeLa.

5.9.6.2. CITOTOXICIDAD DE NS6E EN CÉLULAS MCF7.

La citotoxicidad de la NS6E fue evaluada en células MCF7 y los valores de absorbancia media y desviación estándar, se muestran en la Tabla 37.

Tabla 37. Resultados de citotoxicidad de NS6E en células MCF7.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Absorbancia media	Desviación estándar
0.1	0.4162	0.0117
1	0.3870	0.0034
10	0.3437	0.0058
50	0.0553	0.0068
100	0.0430	0.0083
Control +	0.4798	0.0098
Control -	0.0114	0.0053

Utilizando los resultados de los controles, se obtuvo la ecuación de la recta ($y = 213.46x - 2.4264$), la cual fue de utilidad para determinar el % de viabilidad correspondiente a cada concentración de NS6E (Tabla 38).

Tabla 38. Porcentaje de viabilidad de NS6E en células MCF7.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% Viabilidad
0	100
0.1	86.4
1	80.2
10	70.9
50	9.4
100	6.8

Los porcentajes de viabilidad obtenidos se utilizaron para trazar la curva mostrada en la Figura 64. La IC₅₀ determinada para la porfirina NS6E en células MCF7 es de 23 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

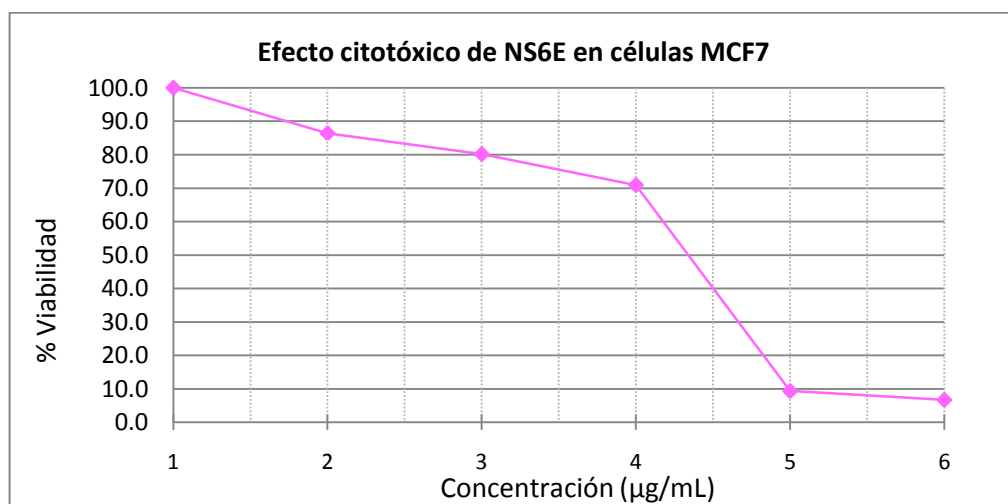


Figura 64. Efecto citotóxico de NS6E en células MCF7.

5.10. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA.

La determinación de la actividad anticancerígena se llevó a cabo en líneas celulares HeLa y MCF7, las porfirinas NS1E – NS6E fueron evaluadas como se describió en la parte de metodología. Después de realizar las lecturas de la placa de 96 pozos (Figura 13 y Figura 14), se obtuvieron 6 valores de cada concentración, se calculó media y desviación estándar; posteriormente, se realizó la curva de “Absorbancia vs tiempo”.

Utilizando la media de los controles positivo y negativo, es decir 100% de viabilidad (células + medio de cultivo) y 0% de viabilidad (células + tritón) se realizó el cálculo de la ecuación de la recta. La ecuación se utilizó para calcular el porcentaje de viabilidad correspondiente a cada concentración evaluada y se realizó la curva “% Viabilidad vs Concentración”; por medio de una interpolación se determinó la IC50 para cada compuesto.

5.10.1. ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NS1E.

5.10.1.1. ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NS1E EN CÉLULAS HeLa.

La actividad anticancerígena de la porfirina no simétrica NS1E se determinó como se estableció en la sección de metodología, y se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 39.

Tabla 39. Resultados de la actividad anticancerígena de NS1E en células HeLa.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Absorbancia media	Desviación estándar
0.1	3.1085	0.1808
1	2.8967	0.1393
10	2.0070	0.1877
50	0.1103	0.0191
100	0.0465	0.0186
Control +	3.2675	0.1621
Control -	0	0.0023

La ecuación de la recta ($y = 30.604x$) se utilizó para la determinación del % de viabilidad de cada concentración evaluada (Tabla 40).

Tabla 40. Porcentaje de viabilidad de NS1E en células HeLa.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% Viabilidad
0	100.0
0.1	95.1
1	88.6
10	61.4
50	3.4
100	1.4

Los porcentajes de viabilidad obtenidos se utilizaron para trazar la curva mostrada en la Figura 65.

La IC₅₀ determinada para la porfirina NS1E en células HeLa es de 18.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

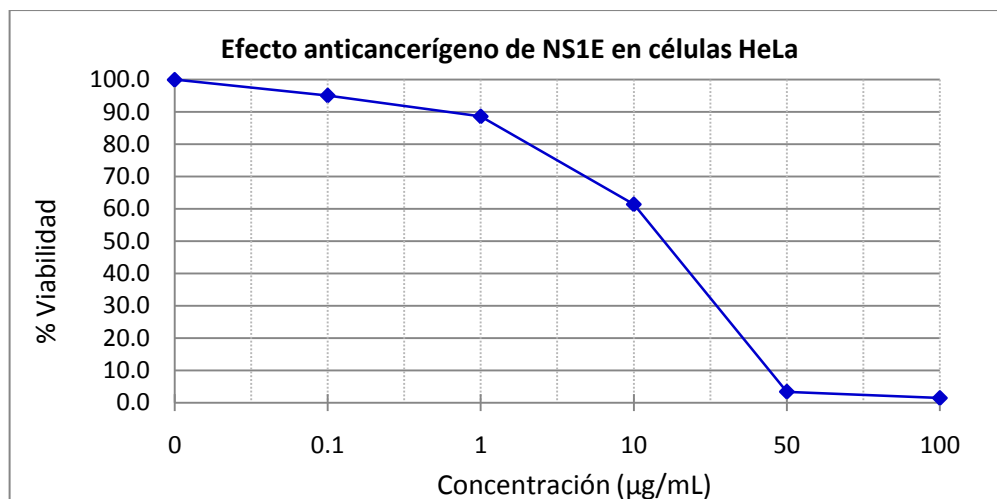


Figura 65. Efecto anticancerígeno de NS1E en células HeLa.

5.10.1.2. ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NS1E EN CÉLULAS MCF7.

La actividad anticancerígena de la porfirina no simétrica NS1E se determinó como se establece en la sección de metodología. La Tabla 41 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 41. Resultados de la actividad anticancerígena de NS1E en células MCF7.

CONCENTRACIÓN (µg/mL)	Absorbancia media	Desviación estándar
0.1	0.4733	0.0298
1	0.4430	0.0296
10	0.1895	0.0365
50	0.0373	0.0056
100	0.0320	0.0074
Control +	0.7025	0.0044
Control -	0.0092	0.0034

La ecuación de la recta obtenida ($y = 144.23x - 1.3221$) se utilizó para la determinación del % de viabilidad correspondiente a cada concentración evaluada (Tabla 42).

Tabla 42. Porcentaje de viabilidad de NS1E en células MCF7.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	% Viabilidad
0	100.0
0.1	66.9
1	62.6
10	26
50	4.1
100	3.3

Los porcentajes de viabilidad obtenidos se utilizaron para trazar la curva mostrada en la Figura 66. La IC₅₀ determinada para la porfirina NS1E en células MCF7 es de 4.4 $\mu\text{g/mL}$.

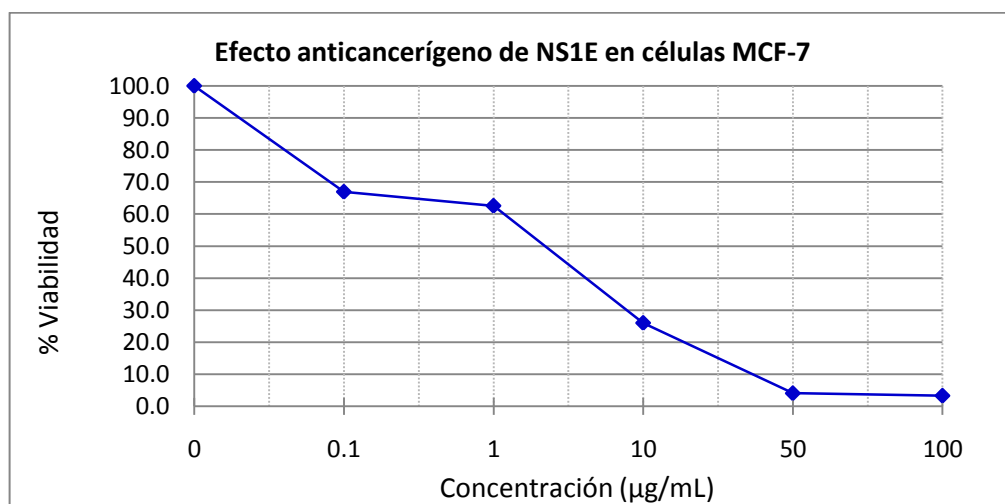


Figura 66. Efecto anticancerígeno de NS1E en células MCF7.

5.10.2. ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NS2E.

5.10.2.1. ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NS2E EN CÉLULAS HeLa.

Los resultados de la actividad anticancerígena *in vitro* de la porfirina no simétrica NS2E se muestran en la Tabla 43.

Tabla 43. Resultados de la actividad anticancerígena de NS2E en células HeLa.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Absorbancia media	Desviación estándar
0.1	2.7962	0.0970
1	2.6610	0.1080
10	1.4288	0.034
50	0.0657	0.0187
100	0.0410	0.0021
Control +	3.2675	0.1621
Control -	0	0.0023

La ecuación de la recta obtenida ($y = 30.604x$) se utilizó para la determinación del % de viabilidad correspondiente a cada concentración evaluada (Tabla 40).

Tabla 44. Porcentaje de viabilidad de NS2E en células HeLa.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% Viabilidad
0	100.0
0.1	85.6
1	81.4
10	43.7
50	2
100	1.3

Los porcentajes de viabilidad obtenidos se utilizaron para trazar la curva mostrada en la Figura 67. La IC₅₀ determinada para la porfirina NS2E en células HeLa es de 8.6 µg/mL.

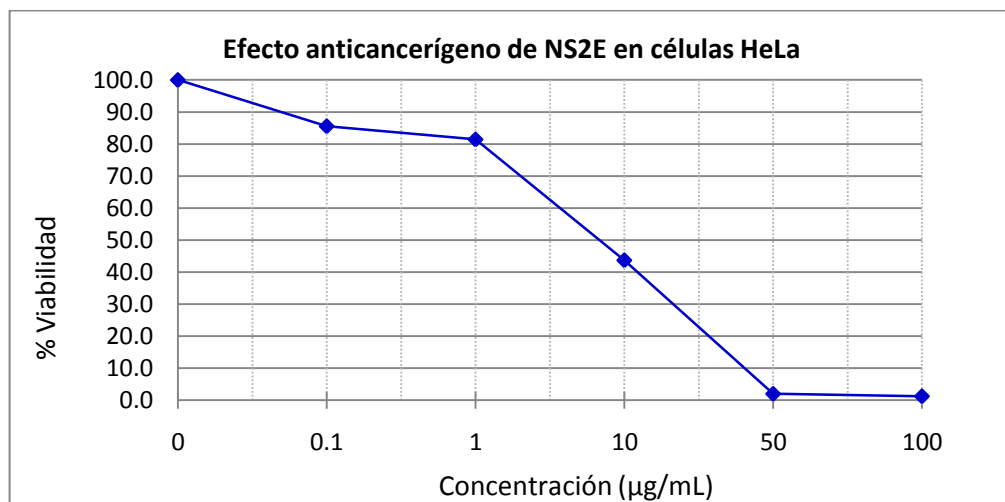


Figura 67. Efecto anticancerígeno de NS2E en células HeLa.

5.10.2.2. ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NS2E EN CÉLULAS MCF7.

La Tabla 45 muestra los resultados de la actividad anticancerígena de NS2E en células MCF7.

Tabla 45. Resultados de la actividad anticancerígena de NS2E en células MCF7.

CONCENTRACIÓN (µg/mL)	Absorbancia media	Desviación estándar
0.1	0.7612	0.1009
1	0.5027	0.0125
10	0.0587	0.0084
50	0.0500	0.0084
100	0.0238	0.0039
Control +	0.8498	0.0695
Control -	0	0.008

La ecuación de la recta obtenida ($y = 117.67x - 2E-14$) se utilizó para la determinación del % de viabilidad correspondiente a cada concentración evaluada (Tabla 46).

Tabla 46. Porcentaje de viabilidad de NS2E en células MCF7.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	% Viabilidad
0	100.0
0.1	89.6
1	59.1
10	6.9
50	5.9
100	2.8

Los porcentajes de viabilidad obtenidos se utilizaron para trazar la curva mostrada en la Figura 68. La IC₅₀ determinada para la porfirina NS2E en células MCF7 es de 3 $\mu\text{g/mL}$.

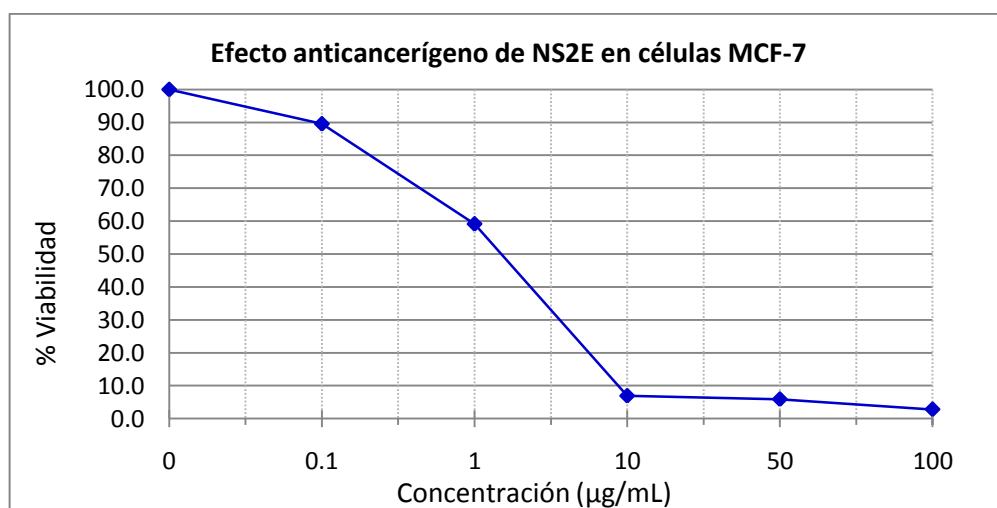


Figura 68. Efecto anticancerígeno de NS2E en células MCF7.

5.10.3. ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NS3E.**5.10.3.1. ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NS3E EN CÉLULAS HeLa.**

Los resultados de la actividad anticancerígena *in vitro* de la porfirina NS3E son mostrados en la Tabla 47.

Tabla 47. Resultados de la actividad anticancerígena de NS3E en células HeLa.

CONCENTRACIÓN (µg/mL)	Absorbancia media	Desviación estándar
0.1	2.9195	0.0598
1	2.5860	0.1134
10	1.2925	0.0257
50	0.4112	0.0824
100	0.2088	0.0252
Control +	3.2675	0.1621
Control -	0	0.0023

La ecuación de la recta obtenida ($y = 30.604x$) se utilizó para la determinación del % de viabilidad correspondiente a cada concentración evaluada (Tabla 48).

Tabla 48. Porcentaje de viabilidad de NS3E en células HeLa.

CONCENTRACIÓN (µg/mL)	% Viabilidad
0	100.0
0.1	89.3
1	79.1
10	39.6
50	12.6
100	6.4

Los porcentajes de viabilidad obtenidos se utilizaron para trazar la curva mostrada en la Figura 69. La IC₅₀ determinada para la porfirina NS3E en células HeLa es de 7.6 µg/mL.

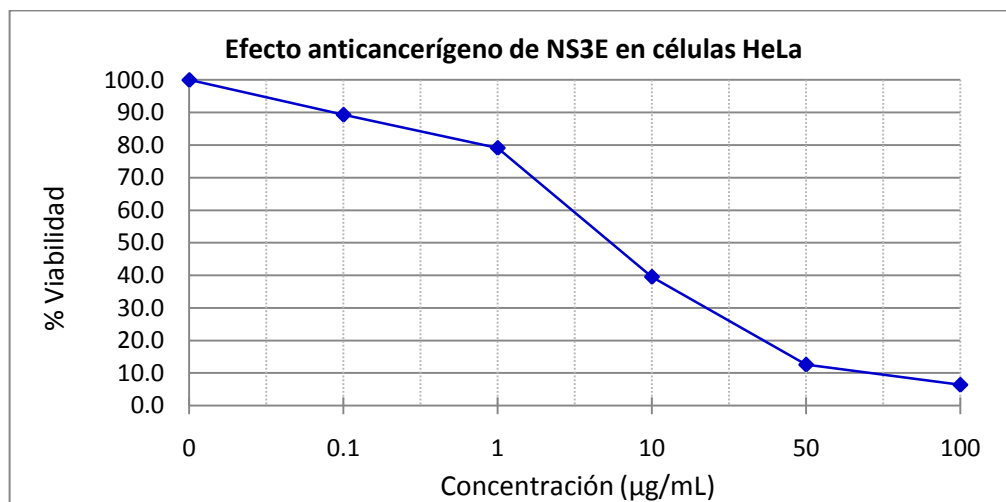


Figura 69. Efecto anticancerígeno de NS3E en células HeLa.

5.10.3.2. ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NS3E EN CÉLULAS MCF7.

La actividad anticancerígena de la porfirina no simétrica NS3E se determinó como se establece en la sección de metodología. La Tabla 49 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 49. Resultados de la actividad anticancerígena de NS3E en células MCF7.

CONCENTRACIÓN (µg/mL)	Absorbancia media	Desviación estándar
0.1	0.5980	0.0153
1	0.4898	0.0256
10	0.1168	0.0119
50	0.0510	0.0023
100	0.0468	0.0023
Control +	0.7025	0.0044
Control -	0.0092	0.0034

La ecuación de la recta obtenida ($y = 144.23x - 1.3221$) se utilizó para la determinación del % de viabilidad correspondiente a cada concentración evaluada (Tabla 50).

Tabla 50. Porcentaje de viabilidad de NS3E en células MCF7.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	% Viabilidad
0	100.0
0.1	84.9
1	69.3
10	15.5
50	6
100	5.4

Los porcentajes de viabilidad obtenidos se utilizaron para trazar la curva mostrada en la Figura 70. La IC₅₀ determinada para la porfirina NS3E en células MCF7 es de 4.4 $\mu\text{g/mL}$.

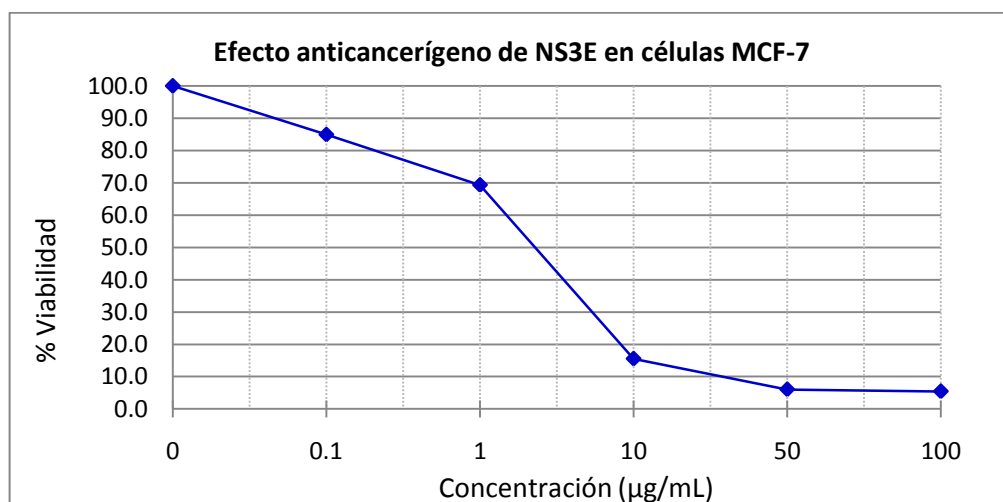


Figura 70. Efecto anticancerígeno de NS3E en células MCF7.

5.10.4. ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NS4E.**5.10.4.1. ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NS4E EN CÉLULAS HeLa.**

Los resultados de la actividad anticancerígena *in vitro* de la porfirina NS4E se muestran en la Tabla 51.

Tabla 51. Resultados de la actividad anticancerígena de NS4E en células HeLa.

CONCENTRACIÓN (µg/mL)	Absorbancia media	Desviación estándar
0.1	0.4143	0.0167
1	0.3980	0.0116
10	0.3483	0.0072
50	0.1675	0.0051
100	0.0215	0.0023
Control +	0.9350	0.0079
Control -	0.0097	0.0059

La ecuación de la recta obtenida ($y = 108.07x - 1.0483$) se utilizó para la determinación del % de viabilidad correspondiente a cada concentración evaluada (Tabla 52).

Tabla 52. Porcentaje de viabilidad de NS4E en células HeLa.

CONCENTRACIÓN (µg/mL)	% Viabilidad
0	100.0
0.1	43.7
1	42
10	36.6
50	17.1
100	1.3

Los porcentajes de viabilidad obtenidos se utilizaron para trazar la curva mostrada en la Figura 71. La IC₅₀ determinada para la porfirina NS4E en células HeLa es de 0.08 µg/mL.

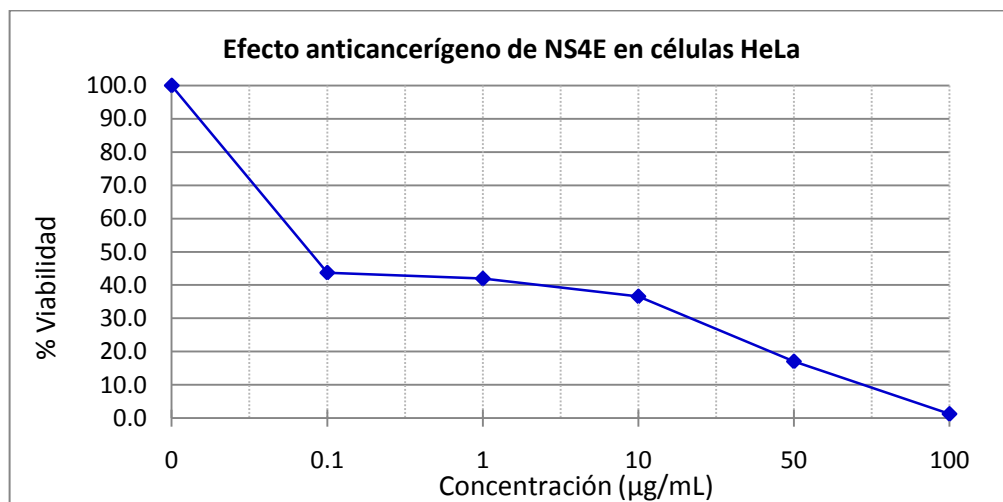


Figura 71. Efecto anticancerígeno de NS4E en células HeLa.

5.10.4.2. ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NS4E EN CÉLULAS MCF7.

La Tabla 53 muestra los resultados de la actividad anticancerígena de NS4E en células MCF7.

Tabla 53. Resultados de la actividad anticancerígena de NS4E en células MCF7.

CONCENTRACIÓN (µg/mL)	Absorbancia media	Desviación estándar
0.1	0.3793	0.0044
1	0.3455	0.0138
10	0.0883	0.0163
50	0.0243	0.0042
100	0.0035	0.0008
Control +	0.3905	0.0148
Control -	0.0114	0.0053

La ecuación de la recta obtenida ($y = 263.76x - 2.9981$) se utilizó para la determinación del % de viabilidad correspondiente a cada concentración evaluada (Tabla 54).

Tabla 54. Porcentaje de viabilidad de NS4E en células MCF7.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% Viabilidad
0	100.0
0.1	97.1
1	88.1
10	20.3
50	3.4
100	0

Los porcentajes de viabilidad obtenidos se utilizaron para trazar la curva mostrada en la Figura 72. La IC₅₀ determinada para la porfirina NS4E en células MCF7 es de 6.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

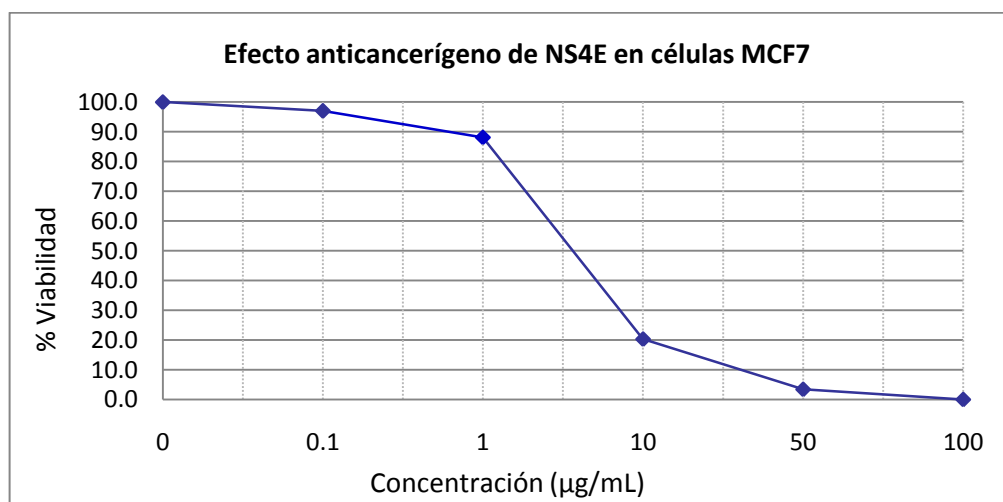


Figura 72. Efecto anticancerígeno de NS4E en células MCF7.

5.10.5. ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NS5E.**5.10.5.1. ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NS5E EN CÉLULAS HeLa.**

Los resultados de la actividad anticancerígena de la NS5E se muestran en la Tabla 55.

Tabla 55. Resultados de la actividad anticancerígena de NS5E en células HeLa.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Absorbancia media	Desviación estándar
0.1	2.8588	0.0709
1	2.5760	0.1014
10	1.2833	0.1044
50	0.0445	0.0179
100	0.0398	0.0033
Control +	3.2675	0.1621
Control -	0	0.0023

La ecuación de la recta obtenida ($y = 30.604x$) se utilizó para la determinación del % de viabilidad correspondiente a cada concentración evaluada (Tabla 56).

Tabla 56. Porcentaje de viabilidad de NS5E en células HeLa.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% Viabilidad
0	100.0
0.1	87.5
1	78.8
10	39.3
50	1.4
100	1.2

Los porcentajes de viabilidad obtenidos se utilizaron para trazar la curva mostrada en la Figura 69. La IC₅₀ determinada para la porfirina NS5E en células HeLa es de 7.6 µg/mL.

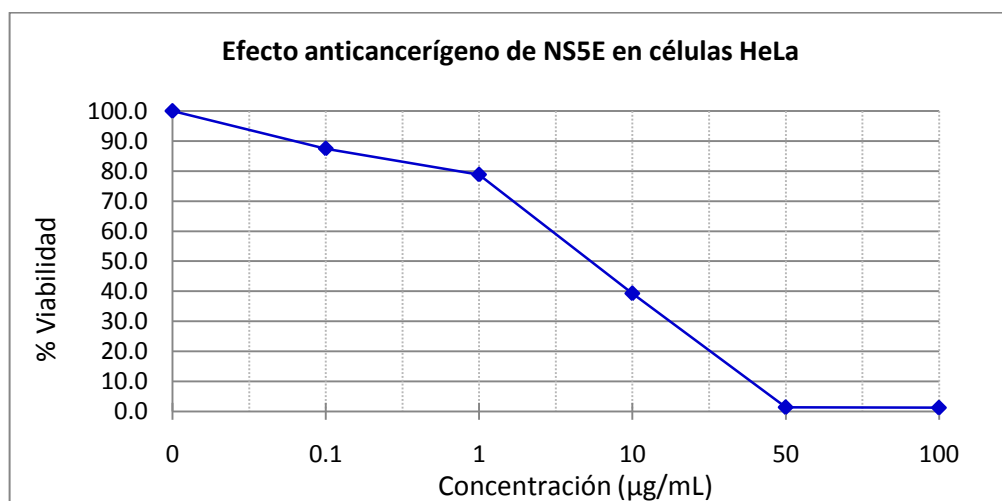


Figura 73. Efecto anticancerígeno de NS5E en células HeLa.

5.10.5.2. ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NS5E EN CÉLULAS MCF7.

La Tabla 57 muestra los resultados de la actividad anticancerígena para NS5E.

Tabla 57. Resultados de la actividad anticancerígena de NS5E en células MCF7.

CONCENTRACIÓN (µg/mL)	Absorbancia media	Desviación estándar
0.1	0.5038	0.0389
1	0.1533	0.0132
10	0.0475	0.0054
50	0.0283	0.0042
100	0.0133	0.0072
Control +	0.7025	0.0044
Control -	0.0092	0.0034

La ecuación de la recta obtenida ($y = 144.23x - 1.3221$) se utilizó para la determinación del % de viabilidad correspondiente a cada concentración evaluada (Tabla 58).

Tabla 58. Porcentaje de viabilidad de NS5E en células MCF7.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% Viabilidad
0	100.0
0.1	71.3
1	21.1
10	5.5
50	2.8
100	0.6

Los porcentajes de viabilidad obtenidos se utilizaron para trazar la curva mostrada en la Figura 74. La IC₅₀ determinada para la porfirina NS5E en células MCF7 es de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

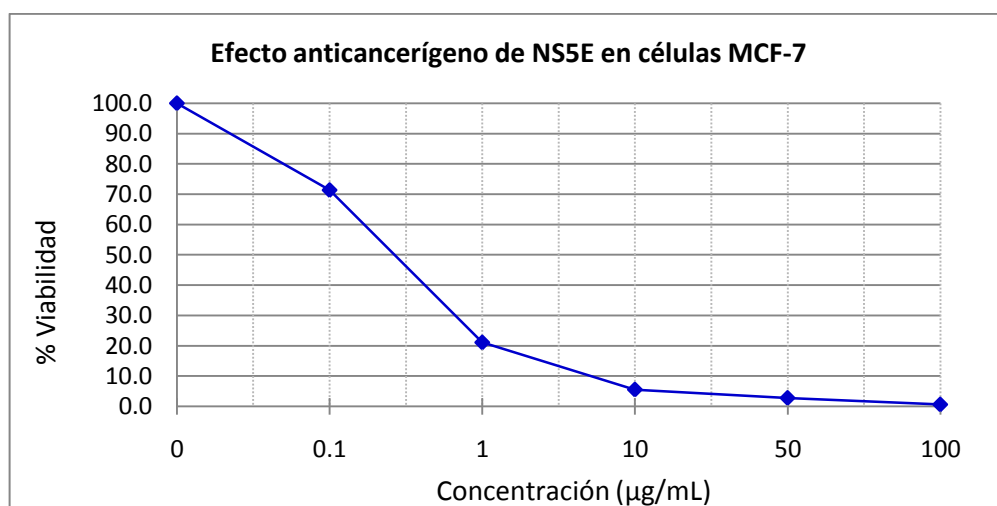


Figura 74. Efecto anticancerígeno de NS5E en células MCF7.

5.10.6. ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NS6E.**5.10.6.1. ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NS6E EN CÉLULAS HeLa.**

La Tabla 59 muestra los resultados de la actividad anticancerígena de la porfirina NS6E en células HeLa.

Tabla 59. Resultados de la actividad anticancerígena de NS6E en células HeLa.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Absorbancia media	Desviación estándar
0.1	0.0742	0.0229
1	0.0217	0.0015
10	0.0212	0.0042
50	0.0227	0.0052
100	0.0113	0.0040
Control +	0.9350	0.0079
Control -	0.0097	0.0059

La ecuación de la recta obtenida ($y = 108.07x - 1.0483$) se utilizó para la determinación del % de viabilidad correspondiente a cada concentración evaluada (Tabla 60).

Tabla 60. Porcentaje de viabilidad de NS6E en células HeLa.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% Viabilidad
0	100.0
0.1	7
1	1.3
10	1.2
50	1.4
100	0.2

Los porcentajes de viabilidad obtenidos se utilizaron para trazar la curva mostrada en la Figura 75. La IC₅₀ determinada para la porfirina NS6E en células HeLa es de 0.054 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

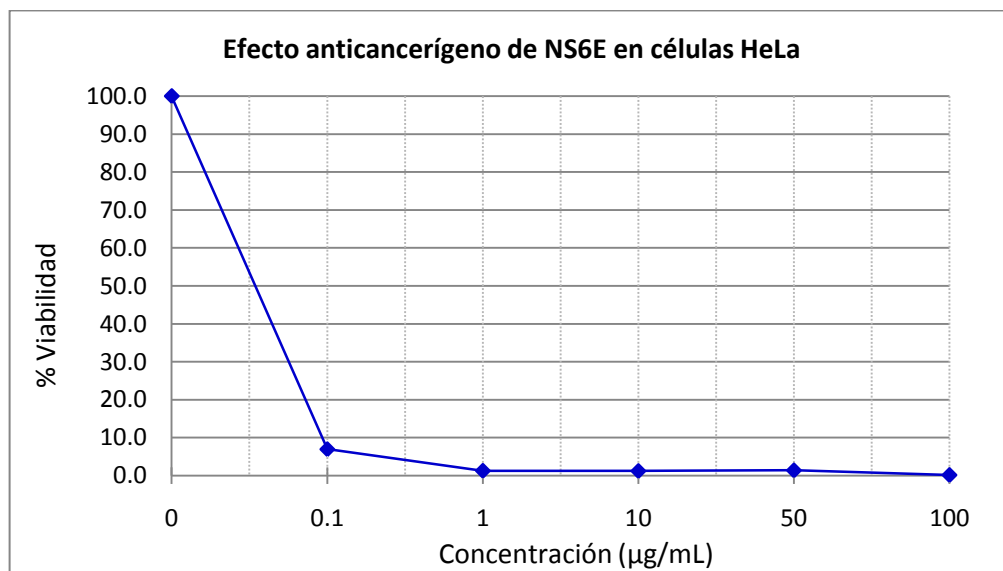


Figura 75. Efecto anticancerígeno de NS6E en células HeLa.

5.10.6.2. ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NS6E EN CÉLULAS MCF7.

Los resultados de la actividad anticancerígena de la porfirina NS6E se muestran en la Tabla 61.

Tabla 61. Resultados de la actividad anticancerígena de NS6E en células MCF7.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Absorbancia media	Desviación estándar
0.1	0.0482	0.0187
1	0.0068	0.0023
10	0.0042	0.0018
50	0.0043	0.0049
100	0.0075	0.0032
Control +	0.3905	0.0147
Control -	0.0114	0.0053

La ecuación de la recta obtenida ($y = 263.76x - 2.9981$) se utilizó para la determinación del % de viabilidad correspondiente a cada concentración evaluada (Tabla 62).

Tabla 62. Porcentaje de viabilidad de NS6E en células MCF7.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	% Viabilidad
0	100.0
0.1	7
1	0
10	0
50	0
100	0

Los porcentajes de viabilidad obtenidos se utilizaron para trazar la curva mostrada en la Figura 76. La IC₅₀ determinada para la porfirina NS6E en células MCF7 es de 0.057 $\mu\text{g/mL}$.

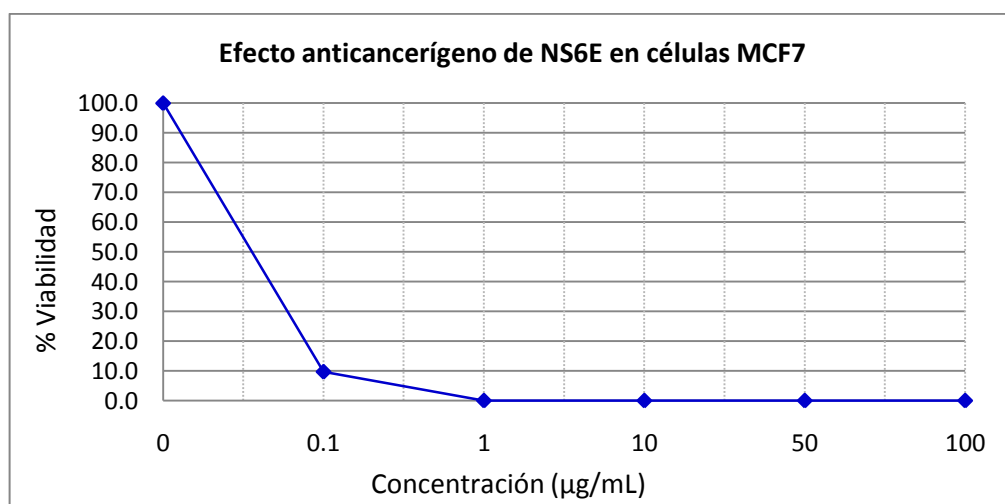


Figura 76. Efecto anticancerígeno de NS6E en células MCF7.

5.11. CITOTOXICIDAD COMPARATIVA DE NS1E-NS6E y THFP EN CÉLULAS

HeLa.

En este apartado se hace una comparación de las porfirinas y el control THFP que fueron aplicados a células HeLa.

Tabla 63. Citotoxicidad de las porfirinas NS1E-NS6E y THFP en células HeLa.

CITOTOXICIDAD							
Concentración µg/mL	% Viabilidad						
	NS1E	NS2E	NS3E	NS4E	NS5E	NS6E	THFP
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
0.1	91.5	83.4	90.0	93.0	70.6	48.9	95.4
1	92.3	75.5	88.2	84.9	61.1	42.2	91.6
10	85.8	55.2	86.1	59.0	59.2	29.2	7.4
50	58.1	47.1	72.2	43.3	43.9	6.4	2.1
100	1.2	1.3	9.9	28.0	0.9	2.1	3.0

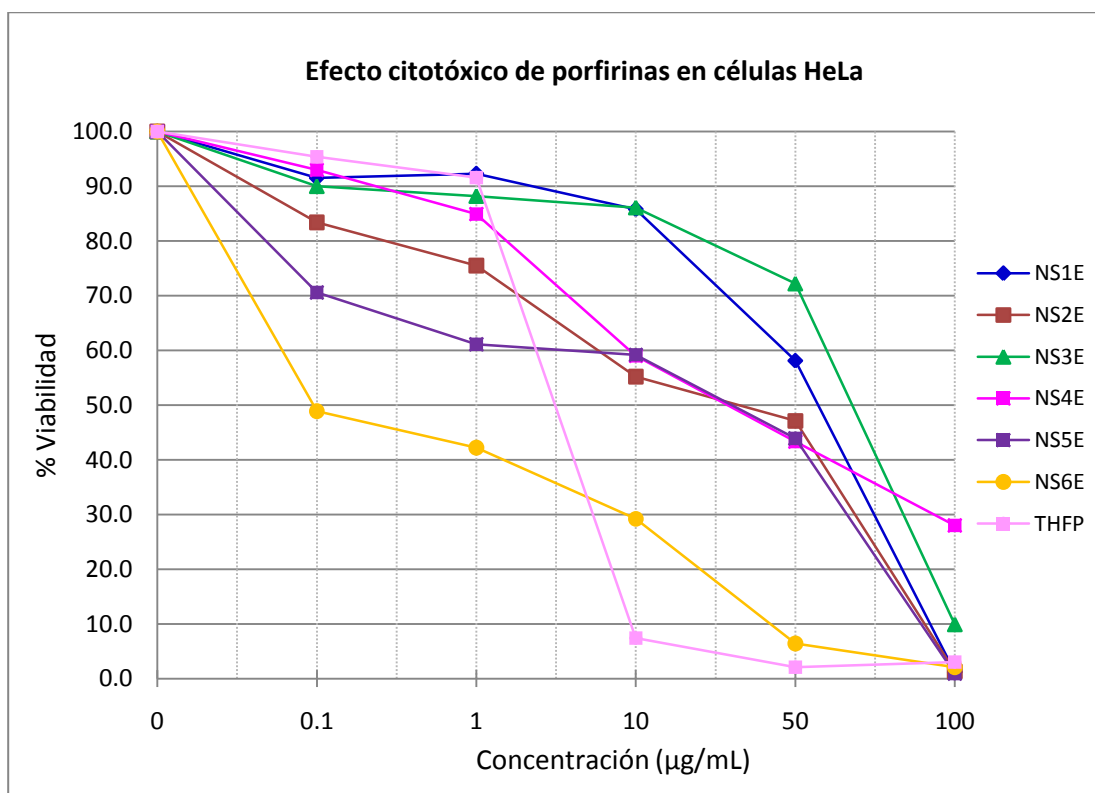


Figura 77. Citotoxicidad de NS1E-NS6E y THFP en células HeLa.

Tabla 64. IC50 de NS1E-NS6E y THFP en células HeLa sin irradiación.

IC50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
NS1E	57.5
NS2E	37
NS3E	68
NS4E	32
NS5E	32.5
NS6E	0.098
THFP	5.5

5.12. CITOTOXICIDAD COMPARATIVA DE NS1E-NS6E y THFP EN CÉLULAS MCF7.

Se realizó una compilación de todos los resultados de citotoxicidad de las porfirinas y el control THFP probados en células MCF7 (Tabla 65).

Tabla 65. Citotoxicidad de NS1E-NS6E y THFP en células MCF7.

CITOTOXICIDAD							
Concentración $\mu\text{g}/\text{mL}$	% Viabilidad						
	NS1E	NS2E	NS3E	NS4E	NS5E	NS6E	THFP
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
0.1	89.4	88.7	89.2	97.1	73.6	86.4	100
1	88.5	74.1	83.3	88.1	68.4	80.2	99
10	85.5	58.1	71.4	20.3	63.8	70.9	28.6
50	35.5	36.1	31.2	3.4	34	9.4	8.1
100	3.4	0	10.7	0	0.7	6.8	7.2

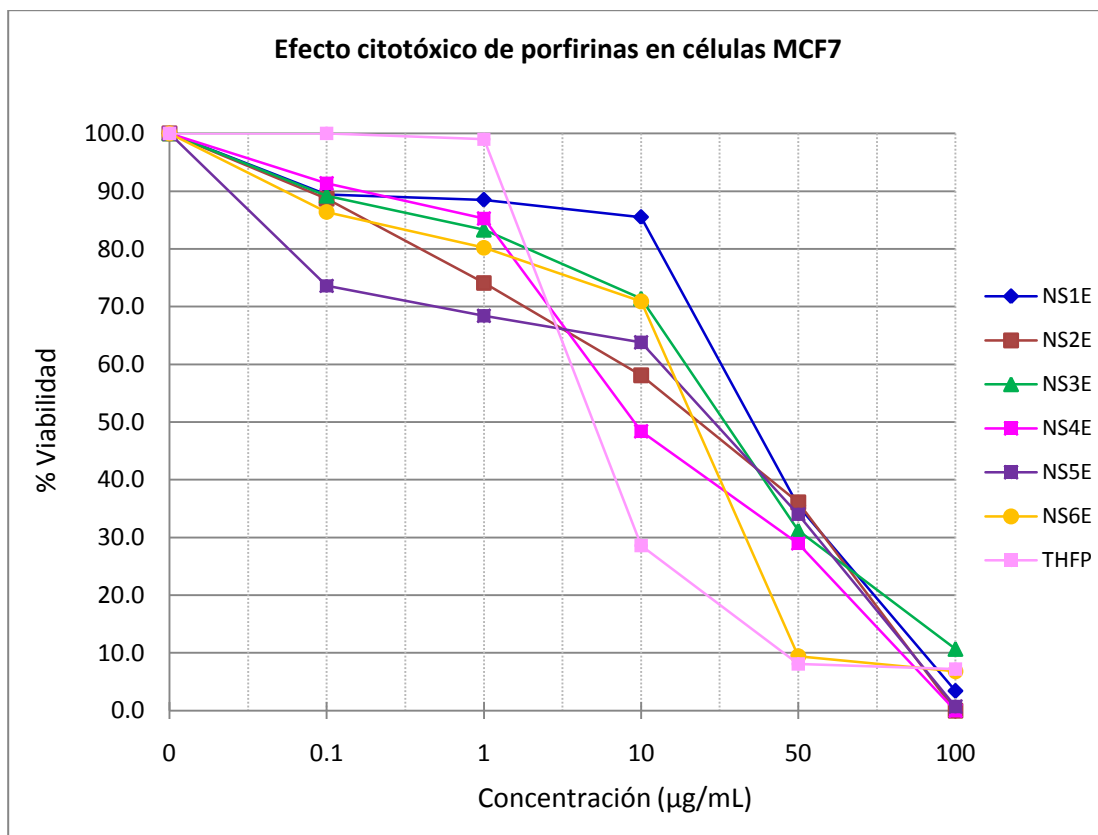


Figura 78. Citotoxicidad de NS1E-NS6E y THFP en células MCF7.

Tabla 66. IC₅₀ de NS1E-NS6E y THFP en células MCF7 sin irradiación.

IC ₅₀ µg/mL	
NS1E	38
NS2E	25
NS3E	32
NS4E	9.5
NS5E	29
NS6E	23
THFP	7.5

5.13. EFECTO ANTICANCERÍGENO COMPARATIVO DE NS1E-NS6E y THFP EN CÉLULAS HeLa.

La actividad anticancerígena de todas las porfirinas y el control en células HeLa, se muestra en la Tabla 67.

Tabla 67. Efecto anticancerígeno de NS1E-NS6E y THFP en células HeLa.

ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA							
Concentración µg/mL	% Viabilidad						
	NS1E	NS2E	NS3E	NS4E	NS5E	NS6E	THFP
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
0.1	95.1	85.6	89.3	43.7	87.5	7	0.6
1	88.6	81.4	79.1	42	78.8	1.3	0
10	61.4	43.7	39.6	36.6	39.3	1.2	0
50	3.4	2	12.6	17.1	1.4	1.4	0
100	1.4	1.3	6.4	1.3	1.2	0.2	0

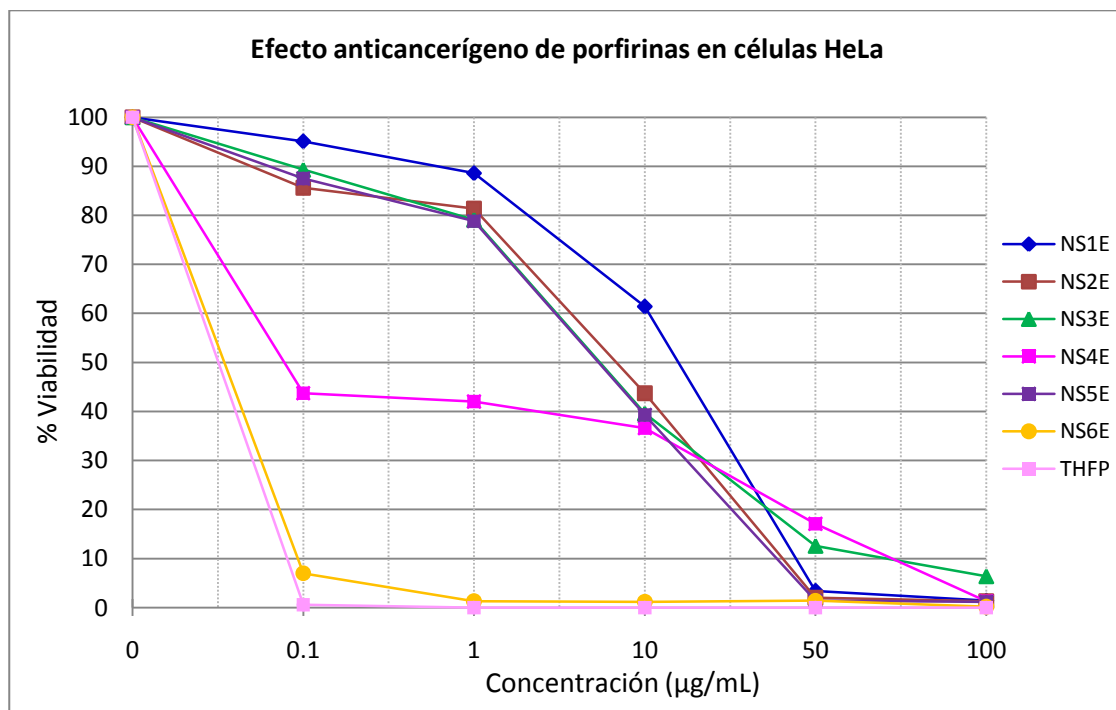


Figura 79. Efecto anticancerígeno de NS1E-NS6E y THFP en células HeLa.

Tabla 68. IC50 de NS1E-NS6E y THFP en células HeLa irradiadas.

IC50 µg/mL	
NS1E	18.7
NS2E	8.6
NS3E	7.6
NS4E	0.08
NS5E	7.6
NS6E	0.054
THFP	0.05

5.14. EFECTO ANTICANCERÍGENO COMPARATIVO DE NS1E-NS6E y THFP EN CÉLULAS MCF7.

En la Tabla 69 se muestra el efecto anticancerígeno en células MCF7, producido por las porfirinas y control THFP.

Tabla 69. Efecto anticancerígeno de NS1E-NS6E y THFP en células MCF7.

ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA							
Concentración µg/mL	% Viabilidad						
	NS1E	NS2E	NS3E	NS4E	NS5E	NS6E	THFP
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
0.1	66.9	89.6	84.9	97.1	71.3	7	0.2
1	62.6	59.1	69.3	88.1	21.1	0	0
10	26	6.9	15.5	20.3	5.5	0	0
50	4.1	5.9	6	3.4	2.8	0	0
100	3.3	2.8	5.4	0	0.6	0	0

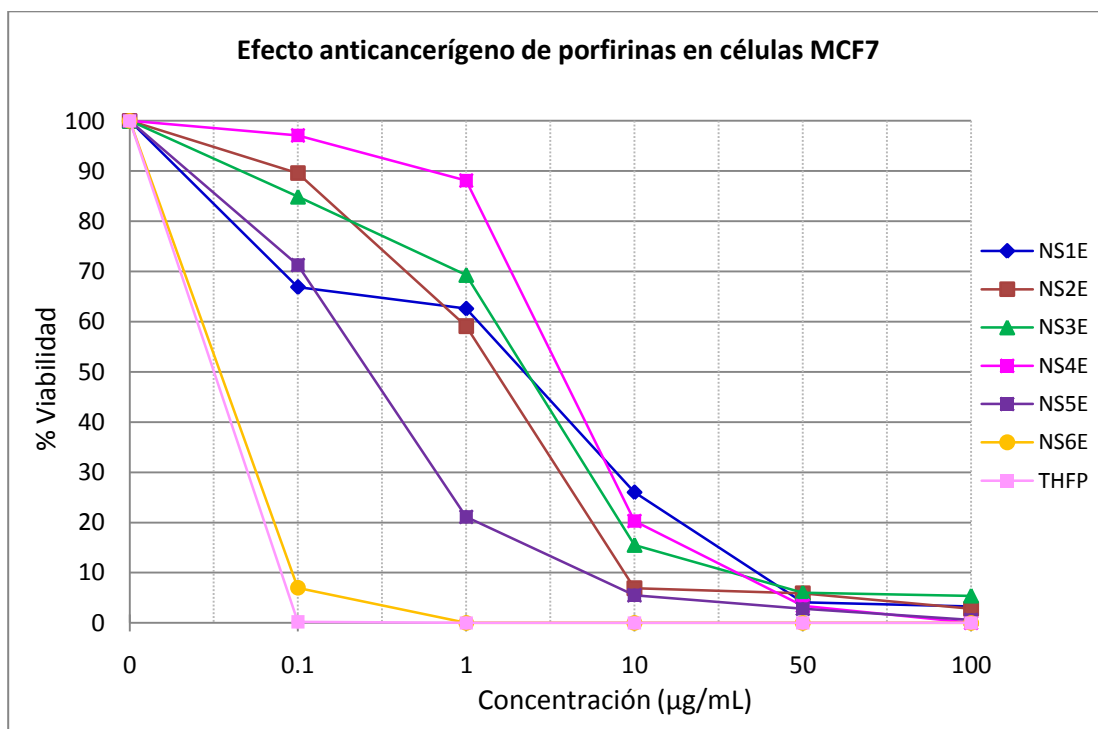


Figura 80. Efecto anticancerígeno de NS1E-NS6E y THFP en células MCF7.

Tabla 70. IC₅₀ de NS1E-NS6E y THFP en células MCF7 irradiadas.

IC ₅₀ µg/mL	
NS1E	4.4
NS2E	3
NS3E	4.4
NS4E	6.3
NS5E	0.5
NS6E	0.057
THFP	0.05

La citotoxicidad intrínseca de las porfirinas fue evaluada al mantener a las células en contacto con los compuestos por 48 h y omitiendo el proceso de irradiación; mientras que la fotoactividad de las porfirinas se determinó al someter a las células 24 h en contacto con los compuestos, irradiar por 2h e incubar por 24 h más; posteriormente, se evaluó la viabilidad celular utilizando el método colorimétrico de WST-1.

Este método se fundamenta en la reducción del 2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolium a sales de formazán por las deshidrogenasas mitocondriales;⁴² es decir que a mayor número de células viables, mayor actividad metabólica y mayor cantidad de WST-1 reducido, por lo tanto mayor generación de color. El cambio en la coloración de la solución se detectó en el lector de ELISA, donde se consideró un blanco de medio de cultivo y se registraron las absorbancias producidas en cada pozo de la placa de reacción.

La porfirina no simétrica NS1E mostró menos potencia en células HeLa, pues su IC50 al ser fotoactivada fue de 18.7 µg/mL, respecto a su citotoxicidad ésta también es baja, con una IC50 de 57.5 µg/mL. Las porfirinas NS2E y NS5E poseen una actividad anticancerígena similar, con una IC50 de 8.6 y 7.6 µg/mL respectivamente; su citotoxicidad también es parecida la cual es de 37 y 32.5 µg/mL respectivamente. Los resultados concuerdan con lo descrito en la literatura, donde establecen que la presencia de fenilos con diferentes sustituyentes en la posición *meso* afectarían al

carácter hidrofóbico/hidrofílico del FS.³³ Considerando los 3 sustituyentes *p*-clorofenilo de las porfirinas NS1E, NS2E y NS3E, éstos les confieren mayor hidrofobicidad a la porfirina, dicha característica química se vio reflejada en los resultados obtenidos (en células HeLa) donde estas porfirinas resultaron ser menos activas que las porfirinas NS4E, NS5E y NS6E las cuales poseen sólo un sustituyente *p*-clorofenilo, lo cual les confieren menor hidrofobicidad, aunado a que la presencia de oxígenos en la NS4E (-OCH₃) y en la NS6E (-OH) le aportan un carácter hidrofílico. Al realizar una comparación entre las porfirinas metoxisustituidas con las hidroxisustituidas (NS1E vs NS3E y NS4E vs NS5E), se establece que se cumple con lo descrito en la literatura, donde se reporta que las hidroxisustituidas son más activas que las metoxisustituidas.³³

Las porfirinas no simétricas NS4E y NS6E resultaron ser los compuestos con mayor actividad anticancerígena en células HeLa, debido a que la IC₅₀ encontrada fue de 0.08 y 0.054 µg/mL respectivamente. La IC₅₀ de la porfirina NS4E sin irradiar muestra una diferencia considerable, ya que presentó un valor de 32 µg/mL. Mientras que la porfirina NS6E presentó una IC₅₀ de 0.098 µg/mL en oscuridad, es decir que produjo una elevada citotoxicidad.

Aunque la porfirina NS6E desarrolló mayor actividad anticancerígena, también resultó ser la más citotóxica, lo cual indica que si se plantea como una opción factible de FS en un futuro, se debe tener en cuenta que posee una citotoxicidad

intrínseca considerable, por lo tanto la ventana terapéutica sería estrecha; lo cual podría verse reflejado en la manifestación de efectos secundarios en células sanas aun sin exponerse a la luz. La situación descrita anteriormente no descalifica a la porfirina NS6E como un potencial FS, debido a que se puede aprovechar su alta actividad al hacer uso de tecnología farmacéutica como lo son el encapsulamiento en liposomas y conjugación con anticuerpos monoclonales. Reportes señalan que la fototoxicidad; una de las limitaciones de la TFD, se puede evitar mediante el uso de la encapsulación liposomal y la distribución del FS mediada por anticuerpos, lo cual evidentemente mejora la eficacia terapéutica. Algunos grupos de investigación han demostrado que aunque la proporción y el grado de encapsulado liposomal sea poco y que la localización intracelular del FS es diferente (entre el encapsulado y el libre), resulta fotodinámicamente más efectivo debido a que la encapsulación en liposomas facilita la captación del FS; con esto se sugiere una reducción en el problema de fototoxicidad que se pudiera presentar. La conjugación con anticuerpos también incrementa la efectividad de la TFD puesto que se presenta la ventaja de que al tener la conjugación, se requieren dosis más bajas del FS que las utilizadas generalmente en la terapia, por lo cual los efectos adversos se verían disminuidos.⁴³

El compuesto menos citotóxico para las células HeLa, fue la porfirina NS3E con 68 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como IC50 y 7.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ al ser fotoactivada. Lo cual es un buen resultado ya que resultó ser un compuesto activo con una menor citotoxicidad intrínseca.

Se propone que la NS4E podría ser considerada como potencial FS (para células HeLa) debido a que mostró actividad en concentraciones del orden de ng/mL y una menor citotoxicidad. También la porfirina NS3E podría ser una buena opción, si bien su IC50 no es tan baja como la de la NS4E, posee una poca citotoxicidad intrínseca; sin embargo, queda mucho trabajo de por medio para que se puedan concretar estas aseveraciones.

Respecto a los resultados de la evaluación de porfirinas en células MCF7, la porfirina NS4E resultó ser la menos activa, con una IC50 de 6.3 $\mu\text{g/mL}$. Las porfirinas NS1E, NS2E y NS3E presentaron IC50 de 4.4, 3 y 4.4 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente y respecto a la citotoxicidad, la IC50 fue de 38, 25 y 32 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Las porfirinas NS5E y NS6E, resultaron ser las más activas refiriéndose al efecto anticancerígeno en células MCF7; la IC50 resultó de 0.5 y 0.057 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente y la citotoxicidad intrínseca mostró una IC50 de 29 y 23 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Todas las porfirinas presentaron una IC50 menor a 6.5 $\mu\text{g/mL}$ cuando fueron fotoactivadas (probadas en células MCF7), y respecto a citotoxicidad la mayor IC50

fue de 38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lo cual sugiere que las células de adenocarcinoma de mama son más susceptibles a este tipo de compuestos.

Al comparar los compuestos sintetizados con el control THFP, la porfirina NS6E mostró una actividad muy semejante al control, siendo igual de activa que en las células HeLa y MCF7 sometidas a la TFD ($\text{IC}_{50} \sim 0.05 \mu\text{g}/\text{mL}$) pero a diferencia de la THFP la NS6E resultó ser menos citotóxica en células MCF7. La actividad presentada por la NS6E y su similitud con el control THFP, se atribuye a que su estructura es parecida y respecto a sus grupos funcionales, la THFP fue la porfirina más polar, seguida de la NS6E. Se eligió a la THFP como control debido a que la literatura ha reportado que su actividad es mayor que el fotofrin ($\text{IC}_{50} = 0.003 \mu\text{g}/\text{mL}$ y $0.074 \mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente, en células de adenocarcinoma de colon humano),¹⁹ el cual se ha utilizado ampliamente en diferentes países como FS en la TFD;²⁷ con los resultados obtenidos se puede realizar una comparación indirecta con el fotofrin en la cual se establece que las porfirinas NS4E, NS5E y NS6E podrían ser más activas que el FS comercial que se ha venido utilizando desde 1993.

Cabe destacar que la NS4E también resultó ser muy activa en células HeLa (IC_{50} $0.08 \mu\text{g}/\text{mL}$) y menos citotóxica que el control, donde la IC_{50} en oscuridad es de $5.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ y para la NS4E es de $32 \mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados presentados por la porfirina NS4E en células HeLa afirman que la actividad es mayor para las porfirinas hidroxisustituidas que para las metoxisustituidas; sin embargo, esto no siempre se

cumple (células MCF7) por lo cual hay que considerar otros factores, como el tipo celular al cual se va a administrar la TFD y una característica fisicoquímica importante, el coeficiente de reparto de cada compuesto, tener en cuenta tanto la hidrosolubilidad como la liposolubilidad, lo cual va a condicionar el paso del FS a través de la membrana celular y de esta manera su actividad antiproliferativa.

5.15. EVALUACIÓN DEL ÍNDICE APOPTÓTICO.

5.15.1. APOPTOSIS PRODUCIDA POR NS4E Y NS6E EN CÉLULAS HeLa y MCF7.

El ensayo de inducción de apoptosis se realizó únicamente para las porfirinas que mostraron mayor actividad anticancerígena, es decir las porfirinas que presentaron la IC50 de menor valor y que además fuera semejante a la del control THFP (IC50= 0.05 µg/mL), con base a lo anterior, se seleccionaron las porfirinas NS4E y NS6E (IC50= 0.08 y 0.054 µg/mL respectivamente).

Para el estudio de apoptosis se realizó la metodología experimental descrita en el Capítulo 4, se incluyeron un control positivo tratado con la enzima nucleasa TACS del kit Trevigen[®] que se utilizó para estos ensayos y un control negativo de apoptosis (células sin tratamiento); simultáneamente se ensayaron las porfirina NS4E y NS6E en células HeLa y MCF7.

La fragmentación del DNA se detectó añadiendo la desoxiuridina biotinilada en los extremos 3'OH libres del DNA mediante la enzima TdT, la estreptavidina peroxidasa se enlaza a estos nucleótidos unidos a biotina los cuales se detectan con el sustrato de peroxidasa, el H₂O₂ y diaminobencidina (DAB). La positividad se identificó con H₂O₂-DAB observando una coloración marrón oscuro en los núcleos positivos o bien núcleos basófilos en los núcleos negativos para esta técnica, para la tinción de contraste se utilizó verde de metilo. Finalmente, las muestras se analizaron mediante microscopía de luz de campo claro y se documentaron los cambios morfológicos observados.

Los resultados obtenidos demuestran que existe una toxicidad selectiva de las porfirinas, la cual depende de la línea celular utilizada, y que la porfirina NS6E es más potente que la porfirina NS4E con respecto a su capacidad para inducir apoptosis. Estos hallazgos concuerdan con los resultados de actividad citotóxica determinada mediante el ensayo de reducción de WST-1 reportados en la sección 5.13 y 5.14 (Tabla 68 y Tabla 70).

En las Figura 81 y Figura 82, puede observarse claramente que las células HeLa son más sensibles que las células MCF7. En el caso de las células HeLa, ambas porfirinas son capaces de inducir apoptosis, siendo mucho más potente la porfirina NS6E que la NS4E (Figura 81 C-E); a nivel morfológico se observa pérdida de las uniones intercelulares manifestada por ruptura de la monocapa

celular, reducción del citoplasma, núcleos picnóticos y formación de “burbujas” en la membrana celular, todos estos son signos de la muerte celular por apoptosis (Figura 81 D y F).

Con respecto a las células MCF7, la morfología e integridad de la monocapa celular se mantienen más conservadas (Figura 82 C-E). La porfirina NS4E aparentemente no induce apoptosis ni cambios morfológicos relacionados a este evento (Figura 82 C-D). La porfirina NS6E tampoco induce apoptosis, sin embargo, es más citotóxica ya que promueve la ruptura de la monocapa celular, reducción citoplásmica y constricción nuclear (Figura 82 E-F); estos últimos hallazgos sugieren la posibilidad que la porfirina NS6E pudiera ser capaz de inducir apoptosis de las células MCF7 si el tiempo de exposición a este compuesto fuese mayor.

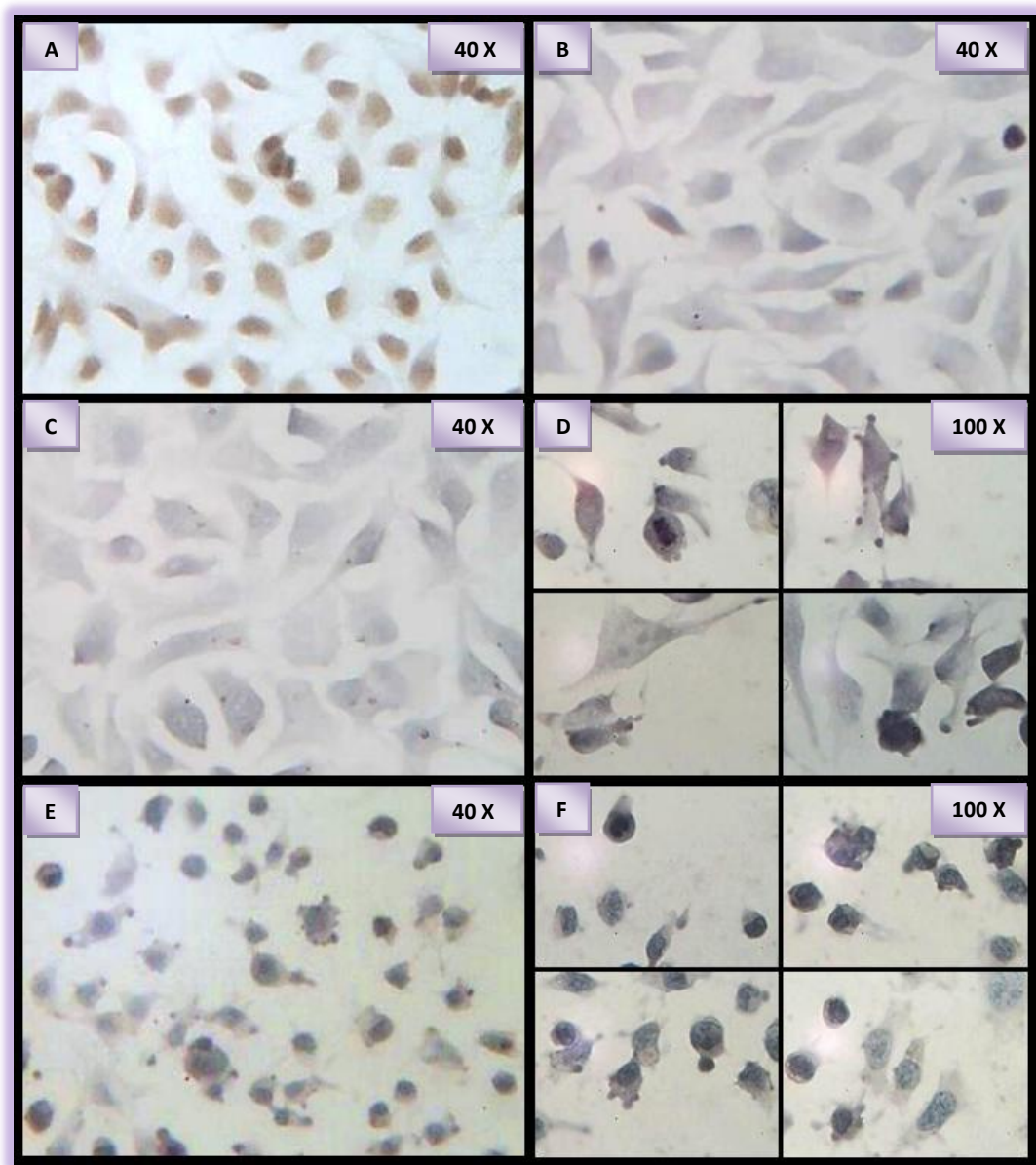


Figura 81. Apoptosis inducida en células HeLa por las porfirinas en estudio. (A) Control positivo. (B) Control negativo. (C-D) NS4E. (E-F) NS6E. Técnica de TUNEL.

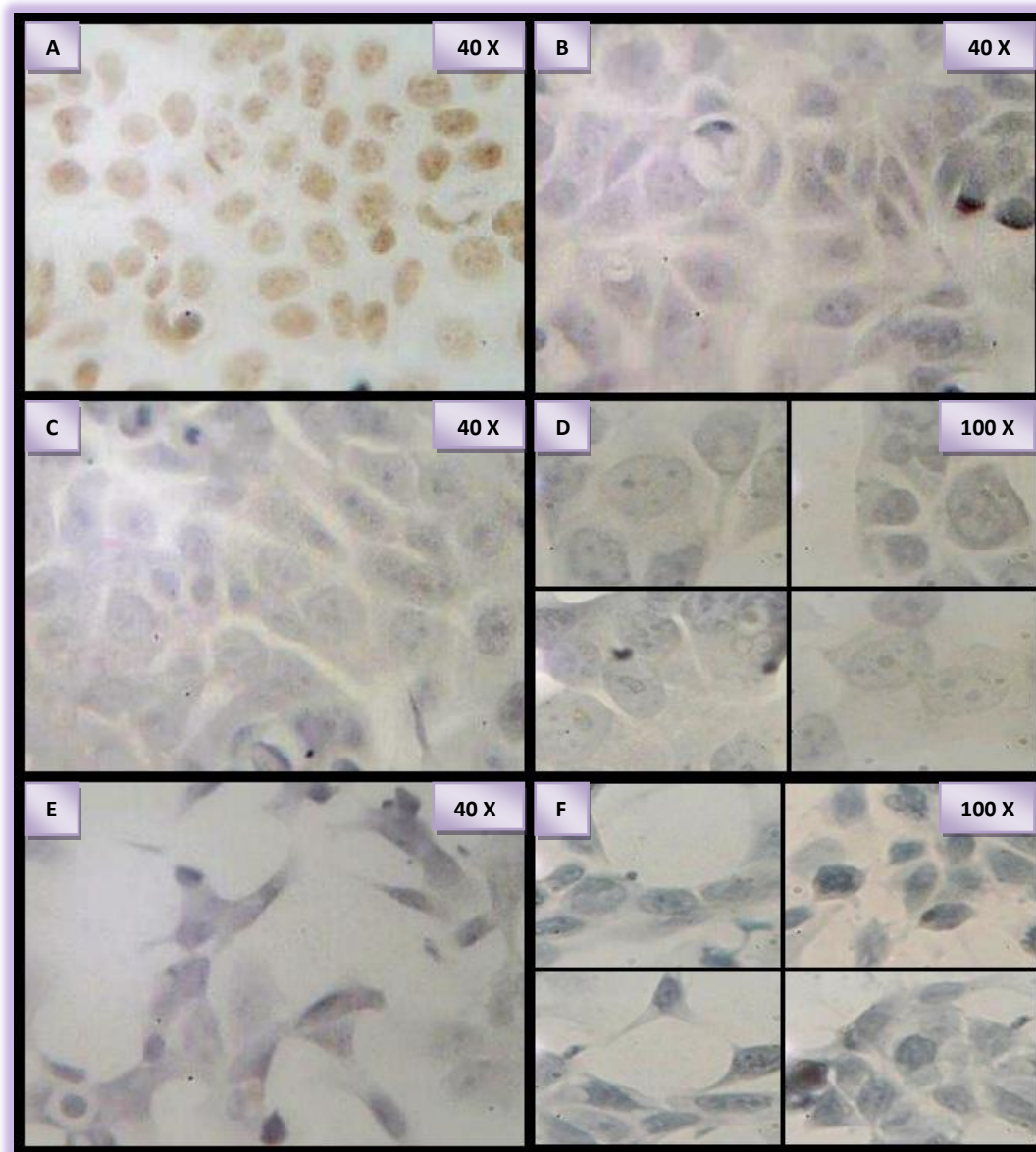


Figura 82. Apoptosis inducida en células MCF7 por las porfirinas en estudio. (A) Control positivo. (B) Control negativo. (C-D) NS4E. (E-F) NS6E. Técnica de TUNEL.

Cómo se puede observar en las imágenes descritas anteriormente, en el caso de las células HeLa, ambas porfirinas son capaces de inducir apoptosis ya que puede observarse a nivel morfológico la pérdida de las uniones intercelulares manifestada por ruptura de la monocapa celular, reducción del citoplasma, condensación de la cromatina¹⁹ y formación de “burbujas” en la membrana

celular. Sin embargo en las células MCF7, la morfología e integridad de la monocapa celular se mantienen más conservadas y las porfirinas más activas aparentemente no inducen apoptosis ni cambios morfológicos tan evidentes como en el caso de las células HeLa. Esto concuerda con lo descrito en la literatura en donde se describe a la apoptosis como la muerte celular programada, que juega un papel importante en el desarrollo de la homeostasis y el mantenimiento de los organismos multicelulares, donde las señales que inducen estos cambios bioquímicos incluyen la activación de las caspasas, la despolarización mitocondrial, la fragmentación del DNA nucleosomal y alteraciones en la expresión de proteínas. Además establece que un proceso de estrés oxidativo originado por la TFD es un común mediador del proceso de apoptosis en donde la respuesta apoptótica depende de la naturaleza del FS, la localización celular y el tipo de células al cual se aplica dicha terapia. Estudios sugieren que el desarrollo de EROs producen cambios mitocondriales que modifican el balance redox lo cual interviene en la abertura de los canales mitocondriales produciendo la liberación de los factores promotores de muerte celular, como lo son el Citocromo C y los factores inductores de apoptosis.⁴⁴

CAPÍTULO 6.

CONCLUSIONES.

- 6.1 Se sintetizaron y purificaron 6 nuevas porfirinas no simétricas del tipo A₃B (NS1E, NS2E, NS3E, NS4E, NS5E y NS6E). La estructura de dichas porfirinas fue corroborada en base a la caracterización por espectrofotometría UV-Vis, Resonancia Magnética Nuclear de Protón, Espectrometría de Masas de baja y alta resolución.
- 6.2 El análisis de fotodegradación realizado permitió corroborar el tiempo de irradiación planteado en la metodología, donde se eligió la lámpara de LED 35W por producir una modificación estructural en el compuesto a evaluar, sin causar un incremento en la temperatura.
- 6.3 La citotoxicidad y actividad anticancerígena *in vitro* observadas tanto para células HELA como MCF7, fue mejor en general para las porfirinas A₃B con *p*-clorofenilo como sustituyente *meso* B (NS4E, NS5E, NS6E) en comparación con las porfirinas con *p*-clorofenilo como sustituyente *meso* A (NS1E, NS2E, NS3), lo cual permite concluir que para estas porfirinas la presencia de 3 *p*-clorofenilos

como sustituyentes *meso* en combinación con *p*-metoxifenilo, fenilo o *p*-hidroxifenilo no le confiere ventajas sobre su actividad fotosensibilizadora *in vitro* a este tipo de compuestos; sin embargo, la presencia de un *p*-clorofenilo como sustituyente *meso* en combinación con 3 *p*-metoxifenilos, fenilos o *p*-hidroxifenilos, si presenta ventajas observables en la actividad fotosensibilizadora *in vitro* de estos compuestos.

6.4 La actividad anticancerígena *in vitro* en general tanto en células HELA como MCF7, fue mejor para las porfirinas con sustituyentes *meso p*-hidroxifenilo que para las que poseen en su estructura *p*-metoxifenilo (NS1E vs. NS3E y NS4E vs. NS6E), lo cual corrobora el mayor efecto de los grupos hidroxilo en comparación con los metoxilo.

6.5 La porfirina NS6E fue la que presentó mayor citotoxicidad (0.098 µg/mL) que el THFP (5.5 µg/mL) y actividad anticancerígena similar (0.054 µg/mL) a la THFP (0.05 µg/mL), en células HELA. Esto sugiere una citotoxicidad intrínseca mayor de NS6E por la presencia del *p*-clorofenilo en posición *meso* en vez del *p*-hidroxifenilo de la THFP. Estos resultados permiten considerar a NS6E como potencial FS (para células HELA).

6.6 La porfirina NS4E presenta menor citotoxicidad (32 µg/mL) que la THFP (5.5 µg/mL) y actividad anticancerígena cercana (0.08 µg/mL) a la THFP (0.05

µg/mL), en células HELA. Estos resultados permiten sugerir a la porfirina NS4E como potencial FS (para este tipo de células), mejor quizá que NS6 debido a su menor citotoxicidad.

6.7 Las porfirinas NS5E y NS6E presentan menor citotoxicidad (29 µg/mL y 23 µg/mL) que la THFP (7.5 µg/mL) y buena actividad anticancerígena (0.5 µg/mL y 0.057 µg/mL) en comparación con la THFP (0.05 µg/mL), en células MCF7. Además, estas dos porfirinas presentaron mejores resultados específicamente en el efecto anticancerígeno en comparación con la NS4E, lo cual sugiere una mejor actividad al estar presentes 3 sustituyentes *meso* fenilo o *p*-hidroxifenilo en combinación con un grupo *p*-clorofenilo (NS5E y NS6E), que el contar en la estructura con 3 sustituyentes *meso* *p*-metoxifenilo en combinación con *p*-clorofenilo (NS4E).

6.8 Las porfirinas NS4E y NS6E son capaces de inducir apoptosis en el caso de las células HeLa y aparentemente no inducen apoptosis en el caso de células MCF7.

6.9 Finalmente, la hipótesis del proyecto no se cumple para las porfirinas estudiadas, sin embargo, se puede afirmar que las nuevas porfirinas del tipo A₃B, NS4E y NS6E (en células HELA) y NS5E y NS6E (en células MCF7) presentan una buena potencia como fotosensibilizadores en comparación con THFP.

ANEXOS

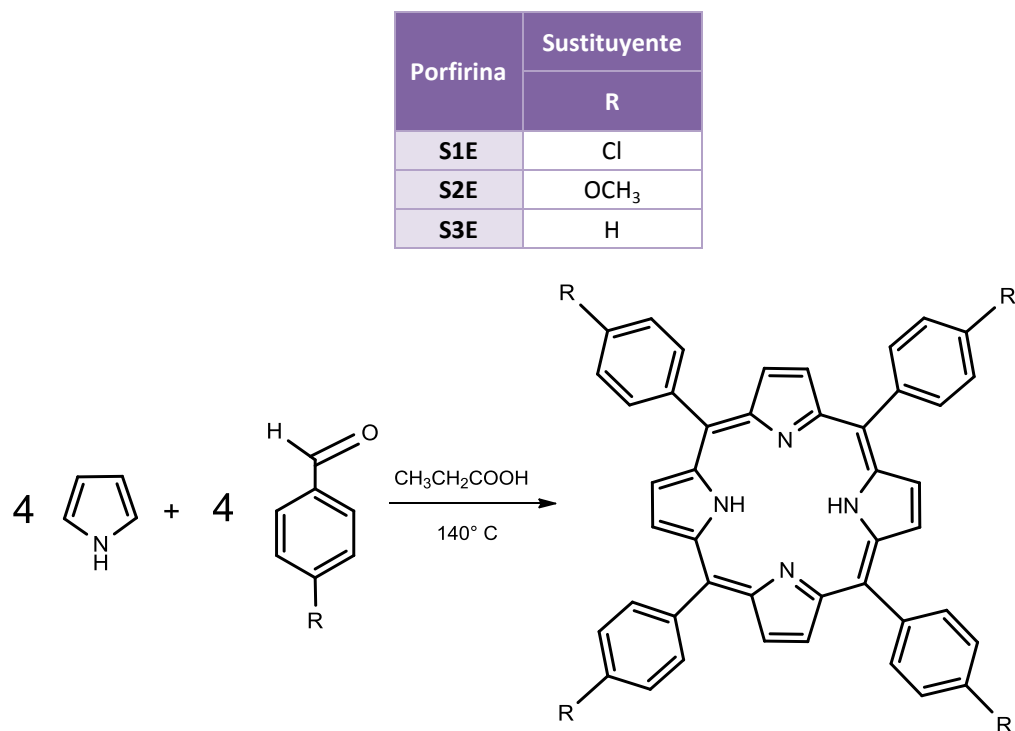
En el siguiente apartado se muestra la metodología utilizada para la síntesis de las porfirinas simétricas, si bien no fue objetivo del proyecto realizar su síntesis, fue necesario hacerlo para utilizarlas como referencia en la purificación de las porfirinas no simétricas A₃B. A continuación se describe la metodología experimental de la síntesis y caracterización de cada una de las porfirinas simétricas sintetizadas.

Cabe señalar que la porfirina simétrica de *p*-hidroxifenilo no se sintetizó en el laboratorio debido a que se contaba con una muestra comercial (ALDRICH) de la molécula 5, 10, 15, 20-Tetrakis (4-hidroxifenil)-21H, 23H- porfirina.

1. METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE LAS PORFIRINAS SIMÉTRICAS.

1.1. Síntesis por el método de Adler.

Las porfirinas simétricas se sintetizaron siguiendo el método de Adler. La ruta de síntesis empleada se llevó a cabo partiendo de cantidades equimolares de pirrol y aldehído en presencia de ácido propiónico como medio de reacción, a 140°C por 40 minutos. (Tabla 71, Esquema 13).³⁷

Tabla 71. Porphirinas simétricas sintetizadas por el método de Adler.**Esquema 13.** Síntesis de porfirinas simétricas por el método de Adler.

1.2. Purificación de las porfirinas simétricas.

La purificación de estos compuestos se llevó a cabo añadiendo metanol frío al crudo de reacción y realizando una serie de lavados con metanol centrifugando a 3000 rpm para precipitar la porfirina y eliminar impurezas.

2. RESULTADOS DE LAS PORFIRINAS SIMÉTRICAS.

2.1. PORFIRINA SIMÉTRICA A₄ *p*-CLOROFENILO (S1E).

2.1.1. SÍNTESIS DE S1E.

Se llevó a cabo la síntesis de la porfirina simétrica A₄ *p*-clorofenilo (S1E) por el método de Adler partiendo de los siguientes reactivos (Tabla 72):

Tabla 72. Reactivos empleados para la síntesis de la porfirina S1E.

REACTIVO	n (mmol)	CANTIDAD
Ácido propiónico	205	15 mL
Pirrol	5	0.35 mL
<i>p</i> -Clorobenzaldehído	5	0.70 g

El método de Adler consiste la reacción entre el pirrol y el aldehído aromático. Para efectuar esta síntesis se hizo reaccionar 5 mmol de pirrol (recién destilado) con 5 mmol de *p*-clorobenzaldehído en ácido propiónico (Esquema 13). La temperatura de reacción fue de 140°C y una vez que inició el reflujo, se dejó 40 minutos. Posteriormente se detuvo la reacción, se dejó enfriar y el crudo de reacción se pasó a un matraz que contenía 10 mL de metanol frío. El crudo de reacción era de color verde oscuro.

2.1.2. PURIFICACIÓN DE S1E.

La purificación de la porfirina simétrica S1E se llevó a cabo mediante lavados del crudo de reacción, primeramente se precipitó con metanol frío y posteriormente se dejó en refrigeración por 12 h. Una vez transcurrido este tiempo, se realizaron los lavados con metanol centrifugando 15 min en cada lavado, desechando el sobrenadante y adicionando nuevamente metanol. Después de los lavados se obtuvo un sólido de color morado.

2.1.3. RENDIMIENTO DE S1E.

La porfirina simétrica de p-Clorofenilo posee una masa molecular de 752.52 g/mol. Después de la purificación del crudo de reacción, se obtuvieron 125 mg de un sólido color morado lo que equivale a un 13.3% de rendimiento.

2.1.4. CARACTERIZACIÓN DE S1E POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE BAJA RESOLUCIÓN.

Una vez realizado el análisis de espectrometría de masas de baja resolución por ionización FAB, se obtuvo el espectro de fragmentación (Figura 83), cuyo objetivo primordial era mostrar el ion molecular y, de esta manera poder cotejar con la masa molecular de la porfirina S1E. La relación masa/carga (m/z) del ion molecular M^+ fue de 752, por lo cual se corrobora que el compuesto sintetizado, purificado y caracterizado, sí corresponde a la porfirina S1E.

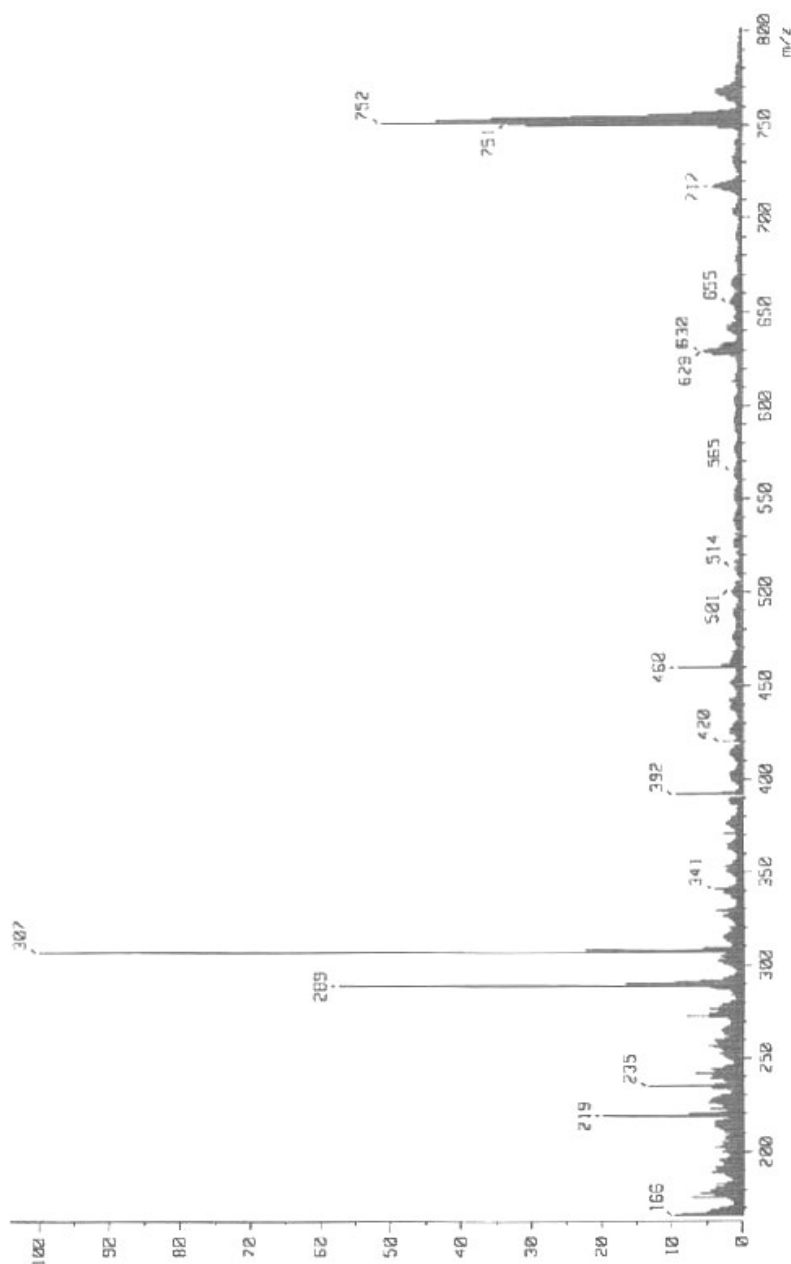


Figura 83. Espectro de masas de la porfirina S1E.

2.2. PORFIRINA SIMÉTRICA A₄ *p*-METOXIFENILO (S2E).

2.2.1. SÍNTESIS DE S2E

La síntesis de la porfirina simétrica A₄ *p*-metoxifenilo (S2E) se llevó a cabo empleando los reactivos establecidos en la Tabla 73 y siguiendo la

metodología descrita para S1E. Posterior al tiempo de reacción, se obtuvo el crudo de color verde oscuro.

Tabla 73. Reactivos empleados para la síntesis de la porfirina S2E.

REACTIVO	n (mmol)	VOLUMEN
Ácido propiónico	205	15 mL
Pirrol	5	0.35 mL
<i>p</i> -Metoxibenzaldehído	5	0.61 mL

2.2.2. PURIFICACIÓN DE S2E.

La purificación la porfirina simétrica S2E se realizó de la misma manera descrita en la sección de metodología. Y posterior a los lavados se obtuvo un precipitado de color morado.

2.2.3. RENDIMIENTO DE S2E.

La porfirina simétrica de *p*-Metoxifenilo posee una masa molecular de 734.29 g/mol. Después de la purificación del crudo de reacción, se obtuvieron 93 mg de un sólido color morado lo que equivale a un 10.13% de rendimiento.

2.2.4. CARACTERIZACIÓN DE S2E POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE BAJA RESOLUCIÓN.

Una vez realizado el análisis de EM de baja resolución (FAB), se obtuvo el espectro de fragmentación (Figura 84). La relación masa/carga (m/z) del ion

molecular M^+ fue de 752, por lo cual se corrobora que el compuesto sintetizado, purificado y caracterizado, sí corresponde a la porfirina S1E.

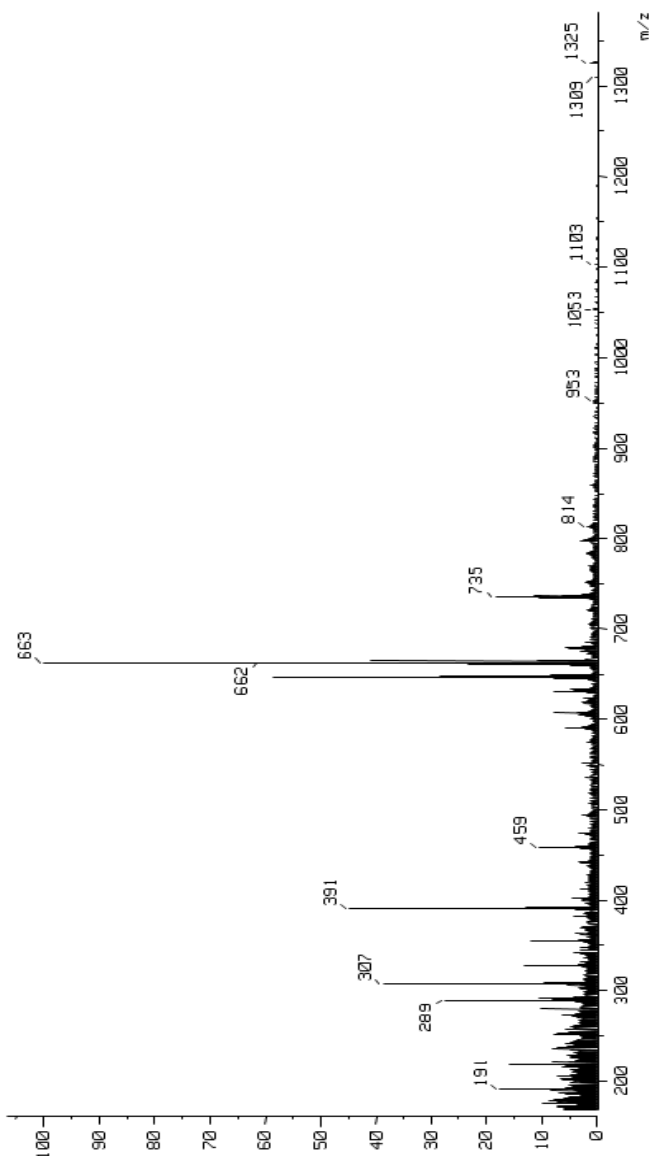


Figura 84. Espectro de masas de la porfirina S2E.

2.3. SÍNTESIS DE LA PORFIRINA SIMÉTRICA A₄ FENILO (S3E).

2.3.1. SÍNTESIS DE S3E.

La porfirina simétrica A₄ fenilo (S3E) fue sintetizada utilizando los reactivos mostrados en la Tabla 74, siguiendo el método descrito para S1E.

El crudo de reacción obtenido presentó una coloración azul oscuro.

Tabla 74. Reactivos empleados para la síntesis de la porfirina S3E.

REACTIVO	n (mmol)	VOLUMEN
Ácido propiónico	205	15 mL
Pirrol	5	0.35 mL
Benzaldehído	5	0.51 mL

2.3.2. PURIFICACIÓN DE S3E.

Una vez realizados los lavados de acuerdo a la metodología descrita para S1E, se obtuvo un sólido color morado.

2.3.3. RENDIMIENTO DE S3E.

La porfirina simétrica de fenilo posee una masa molecular de 614.74 g/mol. Después de la purificación del crudo de reacción, se obtuvieron 30 mg de un sólido color morado lo que equivale a un 3.9% de rendimiento.

2.3.4. CARACTERIZACIÓN DE S3E POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE BAJA RESOLUCIÓN.

Una vez realizado el análisis de EM de baja resolución (FAB), se obtuvo el espectro de fragmentación (Figura 85). La masa molecular de la porfirina simétrica S3E es de 614.74 g/mol y la relación masa/carga (m/z)

obtenida fue de 614, es decir el ion molecular. Este análisis sustenta la obtención de la porfirina simétrica de fenilo.

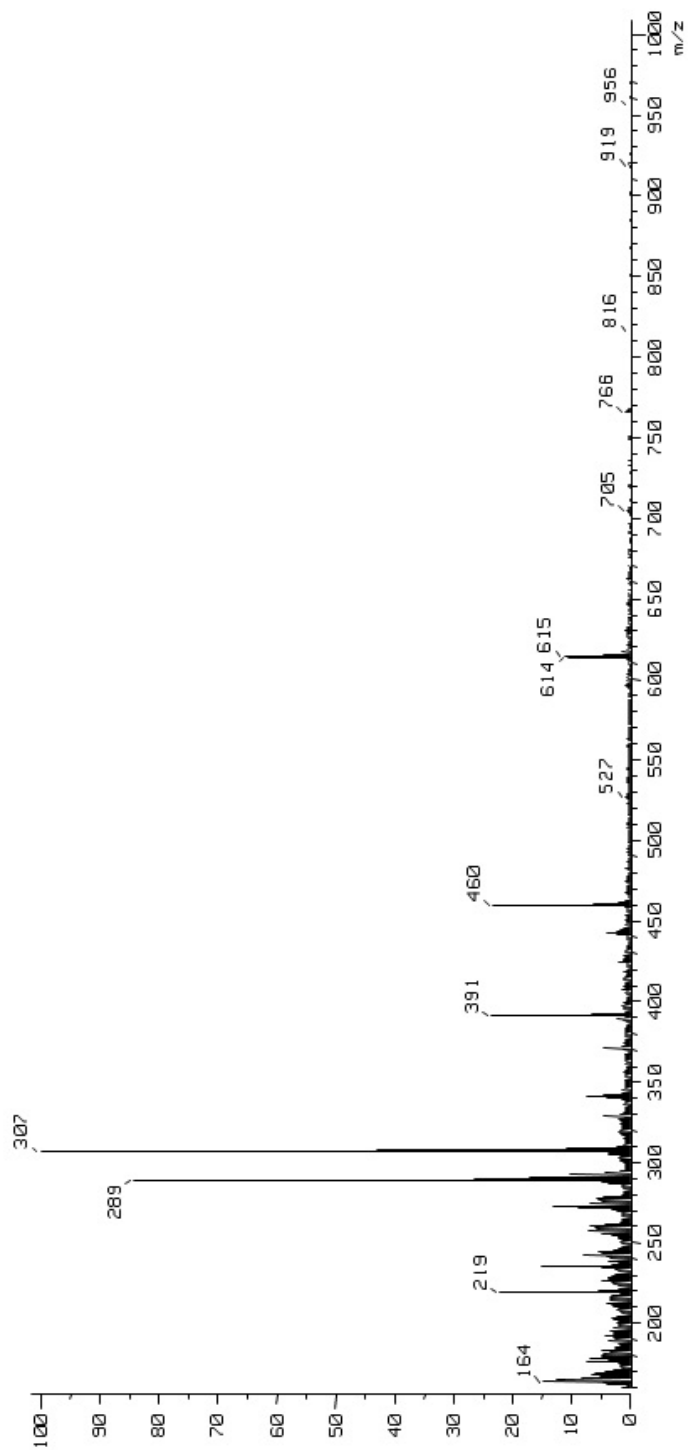


Figura 85. Espectro de masas de la porfirina S3E.

3. DATOS ANALÍTICOS DE LAS PORFIRINAS A₃B SINTETIZADAS.

3.1. NS1E.

- UV-Vis (0.5mg/mL en CH₂Cl₂) λ max: 413, 515, 551, 591 y 647 nm.
- RMN ¹H: δ -2.82 ppm (s, 2H), 4.09 ppm (s, 3H), 7.28 ppm (d, *J* = 8.5, 2H), 7.73 ppm (d, *J* = 8.2, 6H), 8.10 ppm (d, *J* = 8.9, 2 H), 8.12 ppm (d, *J* = 8.2, 6 H), 8.81 ppm (d, *J* = 4.5, 2 H), 8.82 ppm (s, 4H) y 8.90 ppm (d, *J* = 4.7, 2 H).
- EM: Ión molecular M⁺ con una relación *m/z*= 748, masa molecular de la porfirina NS1E: 748.09 g/mol
- EMAR: *m/z*= 748.1602, porcentaje de pureza= 99.7%

3.2. NS2E.

- UV-Vis (0.5mg/mL en CH₂Cl₂) λ max: 412, 514, 549, 588 y 645 nm.
- RMN ¹H: δ -2.83 ppm (s, 2H), 7.73 ppm (d, *J* = 8.0, 6H), 7.77 ppm (m, 3H), 8.13 ppm (d, *J* = 8.0, 6H), 8.20 ppm (d, *J* = 6.9, 2 H), 8.82 ppm (d, *J* = 4.8, 2 H), 8.83 ppm (s, 4 H), 8.86 ppm (d, *J* = 4.6, 2H).
- EM: Ión molecular M⁺ con una relación *m/z*= 718, masa molecular de la porfirina NS2E: 718.07 g/mol
- EMAR: *m/z*= 718.1547, porcentaje de pureza= 99.7%

3.3. NS3E.

- UV-Vis (0.5mg/mL en CH₂Cl₂) λ max: 418, 515, 551, 590 y 646 nm.
- RMN ¹H:

- EM:
- EMAR:

3.4. NS4E.

- UV-Vis (0.5mg/mL en CH₂Cl₂) λ max: 430, 517, 554, 593 y 649 nm.
- RMN ¹H: δ -2.77 ppm (s, 2H), 4.09 ppm (s, 3H), 7.28 ppm (d, J = 8.6, 6H), 7.73 ppm (d, J = 8.3, 6H), 8.12 ppm (d, J = 8.5, 6 H), 8.14 ppm (d, J = 8.3, 2 H), 8.80 ppm (d, J = 4.7, 2 H), 8.87 ppm (s, 4H) y 8.88 ppm (d, J = 4.9, 2 H).
- EM: Relación masa/carga del ión M⁺¹ m/z= 740, masa molecular de la porfirina NS4E: 739.26 g/mol
- EMAR: m/z= 739.2482, porcentaje de pureza de 99.9%

3.5. NS5E.

- UV-Vis (0.5mg/mL en CH₂Cl₂) λ max: 413, 514, 549, 591 y 645 nm.
- RMN ¹H: δ -2.79 ppm (s, 2H), 7.73 ppm (d, J = 8.2, 2H), 7.79 ppm (m, 9H), 8.14 ppm (d, J = 8.1, 2H), 8.21 ppm (d, J = 6.6, 6 H), 8.81 ppm (d, J = 4.6, 2 H), 8.84 ppm (s, 4 H), 8.86 ppm (d, J = 4.8, 2H)
- EM: Relación masa/carga del ión M⁺¹ m/z= 740, masa molecular de la porfirina NS5E: 739.26 g/mol
- EMAR: m/z= 649.2119, porcentaje de pureza de 99.8%

3.6. NS6E.

- UV-Vis (0.5mg/mL en CH₂Cl₂) λ max: 418, 517, 553, 593 y 649 nm.
- RMN ¹H:
- EM: Relación masa/carga del ión M⁺ $m/z= 697$, masa molecular de la porfirina NS6E: 697.18 g/mol
- EMAR: $m/z=$

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Consultado el 28/12/2010
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>
2. National Cancer Institute. Consultado el 10/09/09
http://www.cancer.gov/templates/db_alpha.aspx?lang=spanish&CdrID=45333
3. Organización Mundial de la Salud. Consultado el 01/11/2011
<http://www.who.int/features/qa/15/en/index.html>
4. Instituto Nacional de Cancerología. INFOCÁNCER México. Consultado el 28/12/2010
<http://www.infocancer.org.mx/contenidos.php?idsubsubcontenido=345>
5. Consenso nacional sobre el diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario.3ª revisión. 2008. Consultado el 29/12/2010
<http://www.incan.org.mx/Consenso2008.pdf>
6. Brandan M. E., Villaseñor Y., Detección del cáncer de mama: Estado de la mamografía en México. *Cancerología*. 1: 147-162. **2006**.
7. Lizcano M., Carrillo A., Contreras A., Infección por virus del Papiloma Humano: epidemiología, historia natural y carcinogénesis. *Cancerología*. 4: 205-216. **2009**.
8. Chaturvedi A. K., Engels E. A., Anderson W. F., Gillison M. L., Incidence trends for *Human papillomavirus*- related and- unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *Journal of Clinical Oncology*. 28(4): 612-619. **2008**.
9. Serrano A., Hernández M. C., De la Garza J., Herrera L. A., *Helicobacter pylori* y cáncer gástrico. *Cancerología*. 4: 193-204. **2009**.
10. Palanca B., Zaragoza Q., Meseguer B., Pérez C., Trullenque E., Sempere P., Infección vesical por esquistosoma: una causa inhabitual de hematuria. *Actas Urológicas Españolas*. 32(2): 253-255. **2008**.
11. Clément C., Wakelee H., Lung cancer incidence in never smokers. *European Journal of Clinical & Medical Oncology*. 2(2): 49-57. **2010**.
12. Instituto Nacional de Cancerología. INFOCÁNCER México. Consultado el 02/01/2010
<http://www.infocancer.org.mx/contenidos.php?idsubcontenido=40>
13. Petrelli N., Winer E., Brahmer J., Dubey S., Smith S., *et. al.*, Clinical cancer advances 2009: Major research advances in cancer treatment, prevention, and screening-A report from the American Society of Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology*. 27(35): 6052-6069. **2009**.
14. Instituto Nacional de Cancerología. INFOCÁNCER México. Consultado el 02/01/2010

- <http://www.infocancer.org.mx/contenidos.php?idsubcontenido=34>
15. Granados M., Luna K., Campos E., Lavin A., Cáncer de la laringe: Nuevas estrategias. *Cancerología*. 2: 55-66. **2007**.
 16. Instituto Nacional de Cancerología. INFOCÁNCER México. Consultado el 02/01/2010
<http://www.infocancer.org.mx/contenidos.php?idsubcontenido=37>
 17. Instituto Nacional de Cancerología. INFOCÁNCER México. Consultado el 02/01/2010
<http://www.infocancer.org.mx/contenidos.php?idsubcontenido=39>
 18. Hamblin M. R., Mróz P., *Advances in Photodynamic Therapy, basic translational and clinical*. Artech House. 1. **2008**.
 19. Banfi S., Caruso E., Caprioli S., Mazzagatti L., Canti G., Ravizza R., Gariboldia M., Montia E., Photodynamic effects of porphyrin and chlorin photosensitizers in human colon adenocarcinoma cells, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12: 4853-4860, **2004**.
 20. Fagadar E., Cseh L., Badeac V., Fagadar G., Vlascicid D., Combinatorial Synthesis and Characterization of New Asymmetric Porphyrins as Potential Photosensitizers in Photodynamic Therapy, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 10: 466-472, **2007**.
 21. Nguyen Q., Olson E., Aguilera T., Jiang T., Scadeng M., *et. al.*, Surgery with molecular fluorescence imaging using activatable cell-penetrating peptides decreases residual cancer and improves survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(9): 4317-4322. **2010**.
 22. Vademecum. Consultado el 01/01/2011.
<http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/m013.htm>
 23. Sachs R., Brenner D., Solid tumor risks after high doses of ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(37): 13040-13045. **2005**.
 24. Wiehe A., Aicher D, Stark C., Novel method and application of unsymmetrically *meso*-substituted porphyrins and chlorins for PDT. **2009**.
 25. Choudhary S., Nouri K., Elsaie M., Photodynamic therapy in dermatology: a review. *Lasers Med Sci*. 24: 971-980. **2009**.
 26. Panzarini E., TEnuzzo B., Dini L., Photodynamic Therapy-Induced Apoptosis of HeLa Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1171: 617-626. **2009**.
 27. Pushpan S. K., Venkatraman S., Anand V.G., Parmeswaran D., Ganesan S., *et. al.* Porphyrins in Photodynamic Therapy – A search for Ideal Photosensitizers. *Curr. Med. Chem – Anti-Cancer Agents*. 2(2): 187-207. **2002**.
 28. Hamblin M. R., Mróz P., *Advances in Photodynamic Therapy, basic translational and clinical*. Artech House. 42-43. **2008**.
 29. Bonnett R., Martínez G., Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron* 57: 9513-9547. **2001**.
 30. Rotomskis R., Streckyte G., Bagdonas S., Phototransformations of sensitizers 2. Photoproducts formed in aqueous solutions of porphyrins. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 39: 172-175. **1997**.

31. Rotomskis R., Streckyte G., Bagdonas S., Light-induced processes in aqueous solutions of porphyrins. *Vilnius University Laser Research Center, SPIE* 2625(347). **1996.**
32. Chang, C. J., Yu J. S., Wei F. C., "In vitro and in vivo photosensitizing applications of Photofrin in malignant melanoma cells." *Chang Gung Med. J.* 31 (3): 260-267, **2008.**
33. Banfi S., Caruso E., Buccafurni L., Murano R., Monti E., Gariboldi M., Papa E., Gramatica P., "Comparison between 5,10,15,20-tetraaryl- and 5,15-diarylporphyrins as photosensitizers: synthesis, photodynamic activity, and quantitative structure-activity relationship modeling," *Journal of Medicinal Chemistry*, 49 (11): 3293-3304, **2006.**
34. Alvarez M.G., Penna M., Yslas E. I., Rivarola V., Durantini E. N., "Photodamaging Effects of Porphyrin in a Human Carcinoma Cell Line," *Chem. Educator* 5: 24-26, **2000.**
35. Hamblin M. R., Mróz P., *Advances in Photodynamic Therapy, basic translational and clinical.* Artech House. 14-16. **2008.**
36. Dogutan D. K., Zaidi H. S., Tham Yongkit P., Lindsey J. S., "New route to ABCD-Porphyrins via Bilanes" *J. Org. Chem.*, 72: 7701-7714, **2007.**
37. Adler A. D., Longo, F. R., Finarelli J. D., Goldmacher, J., Assour J., "A simplified synthesis for meso-tetraphenylporphine" *J. Org. Chem.* 32, (2): 476-480, **1967.**
38. Lindsey J. S., Schreiman I.C., Hsu H.C., Kearney P. C., Marguerettaz A. M., "Rothmund and Adler-Longo Reactions Revisited: Synthesis of Tetraphenylporphyrins under Equilibrium Conditions," *J. Org. Chem.* 52, (5): 827-836, **1987.**
39. Králová, J., Bríza, T., Moserová I., Dolenský B., Vasék P., Poucková P., Kejčík, Z., Kaplánek R., Martásek P., Dvorák M. and Král V., "Glycol Porphyrin Derivatives as Potent Photodynamic Inducers of Apoptosis in Tumor Cells," *J. Med. Chem.* 51: 5964-5973, **2008.**
40. Ramón, E., García, M., Reyes, A., "Síntesis de un éster de protoporfirina IX y determinación de su actividad como fotosensibilizador en la Terapia Fotodinámica" *RESPYN*, 7: **2007.**
41. Bonnett R., Martínez G., Photobleaching of Compounds of the 5,10,15,20-Tetrakis(m-hydroxyphenyl)-porphyrin Series (m-THPP, m-THPC, and m-THPBC). *Organic Letters*. 4(12): 2013-2016. **2002**
42. Ishiyama M., Tominaga H., Shiga M., Sasamoto K., Ohkura Y., *et. al.* A Combined Assay of Cell Viability and *in vitro* cytotoxicity with a Highly Water-Soluble Tetrazolium Salt, Neutral Red and Crystal Violet. *Biol. Pharm. Bull.* 19(11):1518-1520. **1996.**
43. Gupta S., Dwarakanath B. S., Chaudhury N.K., Mishra A.K., Muralidhar K., Jain V., *In vitro and in vivo* targeted delivery of photosensitizers to the tumor cells for enhanced photodynamic effects. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 7 (3): 314-324. **2011.**

44. Magi B., Ettorre A., Liberatori S., Bini L., Andreassi M., Selectivity of protein carbonylation in the apoptotic response to oxidative stress associated with photodynamic therapy: a cell biochemical and proteomic investigation. *Cell Death And Differentiation.*, 11: 842-852. **2004.**