

### DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA

### MECANÍSMOS DE MUERTE CELULAR INDUCIDOS POR ACCIÓN DE LA LUZ VISIBLE Y FOTOSENSIBILIZADORES FLAVÍNICOS EN DISOLUCIÓN E INCORPORADOS EN NANOPARTÍCULAS SILILADAS PARA APLICACIÓN EN TERAPIA FOTODINÁMICA

### MARCELO ALEJANDRO MUÑOZ FIGUEROA

Tesis para optar al Grado Académico de Doctor en Química.

Director de Tesis : Dra. Ana María Edwards Mujica

Santiago de Chile, Diciembre de 2017

Ciencia: El arte poco comprendido de predecir el futuro

### AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia, especialmente a Jorge (papá) y Sandra (mamá) por las enseñanzas y valores entregados durante 34 años.

A Gabriela, pareja, compañera de vida y un pilar esencial para seguir hacia adelante en los nuevos rumbos que nos deparará la vida.

A todo aquel que aportó con su grano de arena al desarrollo de las ciencias a través de nuestro laboratorio. A todos los tesistas de pregrado, postgrado, seminaristas, visitantes, profesores, directores de proyecto, etc., que colaboraron desde que comencé en el mundo de las ciencias. Especialmente agradezco la ayuda y apoyo incondicional de Luis Hernán Tagle, Ariadna Pacheco, Angélica García y Emilio Alarcón.

Agradezco al Gobierno de Chile y sus instituciones, Gobierno de Canadá, Gobierno de Brasil y a la Pontificia Universidad Católica de Chile, que, a través de sus programas de apoyo socioeconómico y profesional, me he podido desarrollar al más alto estándar internacional.

Y agradecer a Ana María Edwards, mentora científica, profesional y personal. Que por 13 años me ha guiado en la vida científica y me ha apoyado, en las buenas y en las malas, para seguir adelante y que claudicar no es una opción.

Quizás las cosas se pudieron haber hecho mejor. Pero lo aprendido en otras facetas fue gratificante. El tiempo lo juzgará.

### LISTA DE ABREVIACIONES

- HSA : Albúmina de suero de humano
- DMF : Dimetilformamida
- DPPC : Dipalmitoilfosfatidilcolina
- DPPC-THF: : Dispersión liposomal de Dipalmitoilfosfatidilcolina y tetrahidrofurano
- FF Formulas Farmacéuticas
- HL-60 : Línea celular de leucemia promielocítica humana HL-60
- HeLa : Línea celular de carcinoma de útero
- MC Medio Completo para crecimiento celular
- Si : Silicio
- np : Nanopartícula
- Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> : Magnetita
- Capas dentro de la nanopartícula (lo escrito hacia la izquierda se encuentra hacia la superficie y lo escrito a la derecha se encuentra hacia el nucleo)
- RF : Riboflavina
- RF-Si4 : Riboflavina tetrasililado
- IC : Conversión interna (Intern Conversion)
- ISC : Cruce entre sistemas (intersystem crossing)
- MTT : Bromuro de (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2Htetrazolio
- <sup>1</sup>O<sub>2</sub> : Oxígeno singulete
- PI Yoduro de Propidio
- PBS : Solución tampón fosfato salino (Phosphate buffered saline)
- PDT : Terapia Fotodinámica (Photodynamic therapy)
- PS : Fotosensibilizador (Photosensitizer)
- PSPM : Partículas Super-Paramagnéticas
- Si : Silicio
- TB : Azul Tripán (Tripan Blue)
- THF : Tetrahidrofurano

VR : Relajación vibracional (Vibrational Relaxation)

## ÍNDICE GENERAL

Capítul	ol. In	ntroducción	1	
I.1	Fototerapia Dinámica			
I.2	Meca	nismos de Muerte Celular	8	
I.3	Nano	partículas magnéticas	12	
1.4	Nano	partículas de Silicio	19	
1.5	Hipóte	esis	20	
I.6	Objeti	ivos generales	20	
1.7	Objeti	ivos específicos	21	
Capítul	o II.	Parte Experimental	22	
II.1	Mater	iales, equipos y reactivos	22	
II.1	.1	Reactivos	22	
II.1	.2	Disoluciones	22	
II.2	Métoc	dos	23	
11.2	2.1	Síntesis de los ésteres de Riboflavina (RF):	23	
I	1.2.1.1	2',3',4',5'-Tetrapropionato de Riboflavina (RTP)	23	
I	1.2.1.2	2',3',4',5'-Tetrabutirato de Riboflavina (RTB)	23	
11.2	2.2	Cromatografía en capa fina.	24	
11.2	2.3	Espectros	24	
11.2	2.4	Síntesis y caracterización de RF-Si4	25	
II.2	2.5	Síntesis de la nanopartícula de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	25	
II.2	2.6	Síntesis de RF-Si4@Si	26	
II.2	2.7	Caracterización física de los nanomateriales	27	
II.2	2.8	Liposomas	27	

	II.2.9	Cultivos celulares27
	II.2.10	Viabilidad celular28
	II.2.10.	1 Ensayo de Viabilidad celular por exclusión de Azul tripán. 28
	II.2.10. (MTT)	<ol> <li>Ensayo colorimétrico para cuantificar la viabilidad celular</li> <li>29</li> </ol>
	II.2.10.	3 Tratamiento con Tripsina de células HeLa
	II.2.11	Estudio de incorporación de los fotosensibilizadores30
	II.2.12	Sistema de irradiación31
	II.2.13	Experimentos de irradiación
	II.2.13.	1 Células HL-60 31
	II.2.13.	2 Células HeLa 32
	II.2.14	Microscopía de fluorescencia
	II.2.15	Microscopía electrónica de trasmisión33
	II.2.16	Experimento de Anexina V-FITC y Yoduro de Propidio33
	II.2.17	Citometría de Flujo33
	II.2.18 Si4@Si	Caracterización fotofísica de RF-Si4 y nanopartículas de RF- 34
	II.2.19	Mediciones resueltas en el tiempo35
	II.2.20	Medidas de la fosforescencia de oxígeno singlete
	II.2.21	Oxidación de proteínas35
	II.2.22	Peróxidos
	II.2.23	Carbonilos
	II.2.24	Oxidación de dihidroetidium36
Cap	oítulo III.	Resultados y Discusión
П	I.1 Muer	te celular inducida por riboflavina

III.2	Silila	ción de la riboflavina.		54
III.3	Nand	opartículas en terapia	fotodinámica	69
111.	3.1	Nanopartículas sup	er-paramagnéticas	69
III.3.2 Nanopartículas super-paramagne		super-paramagnéticas	sililadas	
(R	F@Si	@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> )		74
III.4	Prop	iedades fotofísicas y	fotoquímicas de RF-Si4@Si	
III.5	Citot	óxicidad de Nanopart	ículas Sililadas <i>in-vitro</i>	
Capítul	lo IV.	Conclusiones		100

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla III-1: Incorporación de diferentes derivados de riboflavina en células
tumorales
Tabla III-2: Asignación aproximada desplazamiento 1H y 13C 56
Tabla III-3: Parámetros fotofísicos y fotoquímicos de las moléculas en estudio
Tabla III-4: Comparación de absorbancias de difracción a 750 nm

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I-1: Mecanismos de las reacciones fotosensibilizadas2
Figura I-2: Terapia Fotodinámica [6]4
Figura I-3: Estructura química de la Riboflavina6
Figura I-4: Estructura química de Triptófano (izquierda) y Tirosina (derecha) 7
Figura I-5: Tipos de muerte celular [27]9
Figura I-6: Dominios magnéticos de un compuesto paramagnético o
ferromagnético14
Figura I-7: Ciclo de histéresis de un compuesto ferromagnético 15
Figura I-8: Ciclos de histéresis de compuestos ferromagnéticos de diferentes
tamaños 16
Figura I-9: Cambio de magnetización de una partícula de dominio único, y
magnetización fija (izquierda) y magnetización azarosa (derecha) 17
Figura I-10: Ciclo de histéresis de una partícula Superparamagnética 18
Figura II-1: Implementación domestica de agitador de altas revoluciones 26
Figura II-2: Reacción de MTT a formazán por acción del metabolismo de
enzimas mitocondriales [72]29
Figura II-3: Adaptación óptica para homogeneidad del haz de irradiación 37
Figura III-1: Molécula de Riboflavina y sus derivados
Figura III-2: Incorporación de RTB y RTP a diferentes concentraciones 40
Figura III-3: Viabilidad celular de células tumorales irradiadas con
fotosensibilizador
Figura III-4: Citometría de flujo de células HL-60 en presencia de RTP y RTB
Figura III-5: Microscopía electrónica de células tumorales con flavinas 50
Figura III-6: Microscopía electrónica, ampliación de zonas afectadas por
irradiación51
Figura III-7: Microscopía de fluorescencia de células tumorales
Figura III-8: Reacción RF + tri-etoxi(3-propilisocianato)silano

Figura III-9: Descripción numérica de RF-Si4	56
Figura III-10: 1H-RMN	58
Figura III-11: HH-COSY RMN	59
Figura III-12: Ampliación HH-COSY RMN	60
Figura III-13: 13C-RMN	61
Figura III-14: 13C-DEPT-RMN	62
Figura III-15: HC-COSY RMN	63
Figura III-16: HMBC	64
Figura III-17: 1H-RMN de riboflavina tetrabutirato	65
Figura III-18: Desplazamiento de 1H de N-metil-etil-carbamato	67
Figura III-19: Desplazamiento de <sup>13</sup> C, isocianatos y carbamatos tipo	67
Figura III-20: Espectro IR del compuesto RF-Si4	68
Figura III-21: Espectros IR de referencia	69
Figura III-22: Nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	72
Figura III-23: Ejemplo práctico de magnetización de las nanopartículas	73
Figura III-24: Experimento de MOKE sobre @Fe3O4	74
Figura III-25: Microscopía electrónica de Si@Fe3O4	76
Figura III-26: Fluorescencia de Riboflavina incorporada no-covalentement	e en
nanopartículas de Si@Fe3O4 después de sucesivos lavados	77
Figura III-27: Microscopía electrónica de diferentes nanopartículas con o	o sin
núcleo magnético	78
Figura III-28: Absorbancia de diferentes preparaciones de nanopartículas	. 79
Figura III-29: Fosforescencia de <sup>1</sup> O <sub>2</sub> de diferentes nanopartículas	80
Figura III-30: Absorbancia y fluorescencia de RF (línea negra) y RF-Si4 (lín	neas
punteada roja) en disolución	82
Figura III-31: Vida media de la fluorescencia de los productos descritor	s en
Figura III-30	82
Figura III-32: Absorbancia y fluorescencia de Rf-Si4@Si	84
Figura III-33: Tiempo de vida del <sup>1</sup> O <sub>2</sub> generado por RF-Si4@Si	85

Figura III-34: Gráfico que muestra las diferentes condiciones de $kqDPBF$ al
apagar el <sup>1</sup> O <sub>2</sub> generado por RF-Si4@Si86
Figura III-35: Foto-descomposición de los compuestos flavínicos en disolución
irradiada con luz azul
Figura III-36: Consumo de oxígeno en presencia de compuestos con efectos
fotoquímicos
Figura III-37: Formación de Peróxidos por RF-Si4@Si90
Figura III-38: Formación de Carbonilos en HSA mediante nanopartícula de RF-
Si4@Si91
Figura III-39: Fluorescencia de DHE después de reaccionar con radical
superóxido
Figura III-40: Absorbancia de nanopartículas de Silicio y RF-Si4@Si ajustadas
respecto a su línea base
Figura III-41: Absorbancia estandarizada de las nanopartículas de Si y de RF-
Si4@Si
Figura III-42: Viabilidad celular de HL-60 en presencia de RF y RF-Si4@Si95
Figura III-43: SEM nanopartícula de RF-Si4@Si97
Figura III-44: Mólecula de 3-(trietilsilil)-propil isocianato (izquierda) y metil 3-
[(trimetoxisilil)propil] carbamato (Derecha)

# ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema III-1: Esquema de preparación e incorporación de n	anopartículas
paramagnéticas, cubiertas con silicio y RF	70
Esquema III-2: Esquema general de sililación de nanopartículas	[87]75

# ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación II-1: Ecuación	ר que perm	ite el cálcul	o del reno	dimiento	cuántico	de
fluorescencia de una mu	iestra probl	ema				34

#### **RESUMEN**

La terapia fotodinámica (PDT) se ha convertido en una alternativa terapéutica eficiente frente a los tratamientos convencionales para el cáncer. Requiere el uso de un sensibilizador fotoquímico y luz visible para inducir muerte celular pese a que los mecanismos por los cuales se induce una muerte celular programada son multifactoriales, siendo la localización intracelular del fotosensibilizador una característica esencial.

La riboflavina es un sensibilizador fotoquímico endógeno, siendo a la vez un compuesto que está presente en todos los organismos aeróbicos como precursor de los cofactores de todas las flavoenzimas conocidas. Para esta función biológica se requiere cantidades catalíticas del compuesto, las que son insuficientes para provocar los efectos requeridos en terapia fotodinámica. Para aumentar la incorporación a sistemas biológicos en nuestro laboratorio se ha esterificado los cuatro grupos hidroxilo de la cadena ribitil y se ha obtenido derivados hidrofóbicos que mantienen las propiedades fotofísicas y fotoquímicas del fotosensibilizador.

En esta tesis, he estudiado los mecanismos de muerte celular inducidos por acción de la luz visible y fotosensibilizadores flavínicos en células humanas de leucemia HL-60, y en células de carcinoma de útero HeLa, que crecen adheridas al sustrato formando una monocapa. Se demostró que la acción conjunta de la luz visible y fotosensibilizadores flavínicos induce muerte celular programada por apoptosis y también por autofagia, utilizando microscopía electrónica de transmisión, citometría de flujo, microscopía de fluorescencia utilizando marcadores de lisosomas, en conjunto con inhibidores de autofagia. Estos mecanismos presentan la ventaja de no provocar inflamación lo que disminuye los efectos secundarios de una terapia.

Con el objetivo de mejorar la fotoestabilidad y la incorporación de la riboflavina se estudió la posibilidad de incorporarla a nanopartículas. Para poder incorporar el fotosensibilizador en forma estable se preparó un derivado

xii

tetrasililado de la riboflavina, el que mantiene sus propiedades fotofísicas, fotoquímicas.

En una primera etapa se sintetizó nanopartículas magnéticas que fueron caracterizadas por microscopía electrónica de transmisión. El fotosensibilizador fue incorporado haciendo reaccionar el compuesto tetrasililado con una capa de sílica con la que se recubrió la nanopartícula magnética.

Se sintetizó nanopartículas de silicio, a las que se unió covalentemente el compuesto sililado de riboflavina. Las nanopartículas resultaron fotoactivas e producen efectos foto-tóxicos en células HL-60 cuando se irradian con luz azul *in-vitro*.

#### ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) has rapidly become an effective therapeutic alternative to conventional treatments for cancer. It requires the use of a photochemical sensitizer and visible light to specifically induce cancer cell death, despite that the underlying mechanisms involved in cell death are not fully understood they are most likely multifactorial, with the dye intracellular localization being a key one.

Riboflavin is an endogenous photochemical sensitizer, it is present in all aerobic organisms as a precursor to the cofactors of all known flavoenzymes. For this biological function, catalytic amounts of the compound are required, which are insufficient to elicit the required effects in PDT. To increase the incorporation to biological systems in our laboratory the four hydroxyl groups of the ribityl chain have been esterified and hydrophobic derivatives have been obtained, which retained photophysical and photochemical properties of the photosensitizer.

In this thesis, I had studied the mechanisms of cell death induced by the action of visible light and flavin photosensitizers in both human HL-60 leukemia cells, and HeLa human cervix epithelioid carcinoma cells, which grow attached to the substrate forming a monolayer. It is demonstrated that the combined action of visible light and flavin photosensitizers induce apoptosis-programmed and also autophagy cell death, using transmission electron microscopy, flow cytometry, fluorescence microscopy through lysosomal markers, together with autophagy inhibitors. These mechanisms have the advantage of not causing inflammation which decreases the side effects of therapy.

To improve photostability and incorporation of riboflavin, the possibility of incorporating it into nanoparticles was studied. With the aim to incorporate the photosensitizer in a stable form to nanoparticles, a tetrasilylated derivative of riboflavin was prepared. The compound retained the photophysical and photochemical properties of RF.

In a first step, magnetic nanoparticles were synthesized and characterized by transmission electron microscopy. The photosensitizer was incorporated by reacting the tetrasilylated compound with a layer of silica with which the magnetic nanoparticle was coated.

Silicon nanoparticles containing the silylated riboflavin compound were prepared. The nanocomposites were photochemically active, and induced photo-toxic effects in HL-60 cells when irradiated *in vitro* with blue light.

#### Capítulo I. Introducción

#### I.1 Fototerapia Dinámica

La radiación solar constituye no solo la fuente energética inmediata para las plantas verdes y otros organismos autótrofos fotosintéticos sino también para todos los organismos heterótrofos.

La luz del sol que llega a la tierra incluye en su espectro distintas radiaciones caracterizadas por su longitud de onda, el efecto más perjudicial y también más conocido es el ejercido por el espectro ultravioleta (UV). Los organismos pueden ser afectados por acción de la luz en especial, la radiación UV B (290-320), que es el rango en el cual absorben la mayoría de los compuestos celulares.

La radiación visible (400-700) no causa daño directo sobre la mayoría de las moléculas de importancia biológica, sin embargo, en presencia de ciertos tipos de compuestos (que absorben la luz) y de oxígeno molecular, los sistemas biológicos pueden ser dañados por la luz. Estos compuestos son llamados fotosensibilizadores y tienen la característica de absorber la luz visible provocando la modificación de otras moléculas que en su ausencia no serían transformadas por la luz. Estas reacciones fotosensibilizador que se alcanza tras absorber un fotón de longitud de onda adecuada y pasar al estado singlete, el cual tiene un tiempo de vida muy corto lo cual limita sus posibilidades de reacción, el estado singlete puede decaer al estado fundamental por emisión radiativa, fluorescencia o por desactivación no radiativa o pasar a un estado excitado triplete, de menor energía, por cruce entre sistemas. El estado excitado triplete tiene un mayor tiempo de vida que le permite reaccionar con otras moléculas con alta eficiencia.

Las reacciones fotosensibilizadas ocurren por dos mecanismos (Figura I-1): Un mecanismo de tipo I donde el sensibilizador en estado excitado triplete reacciona con moléculas vecinas ocurriendo una transferencia de electrones (o de un átomo de H) entre el sustrato y el sensibilizador, produciendo radicales libres intermediarios que pueden reaccionar con el oxigeno para dar peróxido de hidrógeno y otras especies reactivas del oxígeno (ROS), las cuales son muy reactivas y un mecanismo de tipo II donde ocurre una transferencia de energía desde el sensibilizador al oxígeno molecular <sup>3</sup>O<sub>2</sub>; dando el sensibilizador en estado basal y oxigeno singlete, que es una especie muy reactiva y puede reaccionar con muchas moléculas biológicas. En determinadas condiciones ambos procesos pudieran ocurrir simultáneamente, pero no todos los sensibilizadores reaccionan por ambos mecanismos [1-3]. Como resultado de ambos procesos se producen especies reactivas del oxígeno y entre ellas el oxígeno singulete,  $O_2$ ,  $H_2O_2$ , OH, que son moléculas químicamente muy reactivas que pueden interactuar con moléculas de importancia biológica como: ácidos nucleicos, proteínas y lípidos causando daño severo a las células, incluso muerte celular.





**Figura I-1**: Mecanismos de las reacciones fotosensibilizadas: Resumen de algunos estados energéticos posibles en los cuales pasa un compuesto fotoquímico después de haber absorbido un quantum de luz, desde su estado basal a estado singulete y estado triplete (parte superior). En la parte inferior, el estado triplete puede continuar su proceso

fotoquímico generando radicales con moleculas del medio (tipo I) o transfiriendo su energía al estado basal del  $O_2$  para generar un  ${}^1O_2$  (tipo II).

Basándose en esta propiedad de los fotosensibilizadores su uso en medicina se ha incrementado en los últimos años con su aplicación en una nueva forma de terapia para el tratamiento de una serie de enfermedades humanas, entre ellas el diagnóstico y tratamiento del cáncer (cáncer de mucosas, superficiales, de piel, condiciones precancerosas, displasia de esófago Barrett y otras enfermedades como la degeneración macular) [4]. Esta forma de terapia recibe el nombre de **Terapia Fotodinámica** (PDT) (Figura I-2), la cual está basada en el uso de fotosensibilizadores (PS) que se acumulan o retienen preferencialmente en el tejido tumoral, irradiando posteriormente el tumor con luz visible para activar el fotosensibilizador y generar especies citotóxicas, como ROS que llevan a la destrucción irreversible del tejido de forma localizada de manera que sólo la masa neoplásica irradiada es dañada [5]. Como la mayoría de los fotosensibilizadores actúan por mecanismo de tipo II necesitan de la presencia de oxígeno, siendo esta la principal limitante de la terapia fotodinámica en tumores en condiciones de hipoxia.



Photodynamic Therapy of Cancer.



A partir del trabajo pionero de Dougherty [7], esta nueva metodología ha sido el objeto de una intensa investigación [7-17] y en la actualidad algunos fotosensibilizadores ya han sido aprobados y se encuentran en fase clínica como por ejemplo Fotofrin ®, Foscan ®, Visudyne ®. La PDT comparada con otros tratamientos anticancerígenos como son cirugía, terapia de radiación y quimioterapia, ofrece la ventaja de ser un método selectivo y efectivo que destruye los tejidos enfermos sin ocasionar grandes daños a los tejidos vecinos. Pese a lo anterior, una de las desventajas importantes del tratamiento es la poca selectividad de las primeras drogas que salieron al mercado, generando fotosensibilidad dérmica en las zonas expuestas a la luz ambiental [7]. Los mecanismos de toxicidad involucrados en este tipo de terapia y su eficiencia depende de varios factores como: las propiedades químicas del PS, de las formulaciones farmacéuticas (FF) (una de las grandes limitantes de esta terapia es la dificultad en la preparación de las FF que facilite su administración parenteral), de la localización física y acumulación del PS en el tejido de interés, el tiempo de irradiación, la dosis de luz usada, la cantidad de oxígeno presente y de las biomoléculas dañadas, esto último está íntimamente ligado a la localización subcelular del PS[18].

Para lograr una eficiente localización preferencial en el tejido se están estudiando diferentes estrategias que incluyen conjugación con polímeros o encapsulación de la droga en transportadores coloidales, como dispersiones en aceites, liposomas y partículas poliméricas.

Al estudiar el comportamiento de los sensibilizadores utilizados en PDT se han utilizado liposomas como modelos de la membrana celular. La incorporación de fotosensibilizadores DOCO solubles en sistemas agua en compartimentalizados como liposomas, emulsiones de aceite o ciclodextrinas [19-21], permite su adición a cultivos celulares y también su inyección sistémica al torrente sanguíneo, permitiendo de esta manera estudiar su comportamiento in-vivo e in-vitro. Se ha demostrado que algunas formulaciones de liposomas y emulsiones en aceites son vehículos muy adecuados para la administración de fotosensibilizadores in-vivo y se ha encontrado una correlación entre la incorporación al tejido tumoral y la hidrofobicidad del compuesto [18]. Un buen sensibilizador debe ser un compuesto químicamente puro y con mínima toxicidad en la oscuridad, solamente citotóxico en presencia de la luz, ser rápidamente excretado desde el cuerpo para proveer baja toxicidad sistémica, tener un alto rendimiento cuántico para eventos fotoquímicos, tener una alta absorbancia con un alto coeficiente de extinción molar (el ideal es donde la penetración de la luz al tejido es máxima y la longitud de onda de la luz es aun energética como para producir oxígeno singlete).

En nuestro laboratorio se ha estudiado a la Riboflavina (RF) que es una vitamina hidrosoluble del complejo B (vitamina B2) que esta presente en organismos vivos aeróbicos porque es el precursor de dos coenzimas muy importantes para el metabolismo celular: la flavina mononucleotido (FMN) y la flavina adenina dinucleotido (FADN).





En presencia de la luz la RF tiene características de fotosensibilizador siendo muy eficiente ya que además de actuar por mecanismo de tipo II como la mayoría de los fotosensibilizadores generando oxígeno singlete, puede actuar por mecanismo de tipo I produciendo otras especies reactivas del oxígeno (ROS) como son el anión superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno [22]. La RF en presencia de aminoácidos fotooxidables como tirosina (Tyr) y triptofano (Trp), (Figura I-3 y Figura I-4), genera fotoproductos muy citotóxicos, aun en condiciones de baja concentración de oxígeno (cosa que no hacen la mayoría de los fotosensibilizadores que son tóxicos, pues dependen el oxígeno para producir las especies toxicas).

Como se había mencionado anteriormente la RF puede actuar por dos mecanismos en su reacciones de fotosensibilización. El mecanismo tipo I se inicia con la abstracción de un electrón (o de átomos de H) generando especies radicalarias, las cuales son muy reactivas químicamente y en muchos casos reaccionan con oxígeno para dar productos oxidados (peróxidos) (fotoproductos tóxicos) y especies reactivas de oxígeno como anión

superoxido, peróxido de H, radical hidroxilo. La RF tiene la ventaja de generar fotoproductos en presencia de a.a. fotooxidables. Aún a concentraciones muy bajas de oxígeno la RF fotooxida esos sustratos lo cual la hace una interesante fuente de estudio para una posible aplicación en terapia fotodinámica.

La RF triplete también puede reaccionar por transferencia de energía desde la RF al oxígeno, pasando esta a estado basal y produciendo oxígeno singlete el cual es una especie muy reactiva y es capaz de reaccionar con diversos sustratos oxidándolos.

En experimentos anteriores realizados en nuestro laboratorio se demostró que al irradiar directamente cultivos de células tumorales en presencia de RF se provoca muerte celular, la que aumenta considerablemente al adicionarse al medio tirosina (Tyr), triptófano (Trp) y algunos de su derivados como el ácido 3-indol acético. Esto se debe a la formación de fotoproductos que provocan una drástica citotoxicidad, sobre células tumorales mieloides de ratón y humanas [1, 2, 23].



Figura I-4: Estructura química de Triptófano (izquierda) y Tirosina (derecha)

Se comprobó que esta toxicidad aumentaba al adicionar a los cultivos celulares fotoproductos generados bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. Esto permitiría su aplicación como sensibilizador en condiciones de hipoxia lo cual es una gran ventaja.

En general una condición que aumenta la eficiencia de un fotosensibilizador es su incorporación a tejidos o células en cultivo. La RF es un excelente fotosensibilizador pero al ser una vitamina hidrosoluble presenta baja incorporación a las células. Con el fin de aumentar la incorporación del fotosensibilizador a sistemas biológicos, en nuestro laboratorio se esterificaron los cuatro grupos OH de la cadena ribitil de la RF incrementando la hidrofobicidad con el largo de la cadena alquílica, obteniéndose los esteres de RF: 2',3',4',5'-tetrabutirato (RTB), 2',3',4',5'-tetracetato (RTA), 2',3',4',5'-tetrapropionato (RTP) y 2',3',3',4',5'-tetrapalmitato de RF (RTPa), los cuales han sido caracterizados demostrándose que mantienen las propiedades fotoquímicas y fotofísicas de la RF (Figura III-1) [24]. Se ha demostrado que la incorporación de los ésteres flavínicos a células de leucemia humana HL-60 aumenta con la hidrofobicidad del compuesto [24].

Se sabe que los fotosensibilizadores inducen muerte celular al ser irradiados a una longitud de onda determinada posiblemente por la producción de especies reactivas del oxígeno y de otros fotoproductos que se forman en presencia de aminoácidos fotooxidables como el Trp.

#### I.2 Mecanismos de Muerte Celular

La muerte celular es un fenómeno que puede ser el resultado de tres mecanismos diferentes, la necrosis la apoptosis (también llamada muerte celular programada) y la autofagia. Existen características funcionales y morfológicas que diferencian a los tipos de muerte, las que son inducidas bajo diversas condiciones.

La necrosis conocida también como muerte celular patológica es un proceso violento y catastrófico, que se da cuando la célula presenta daño severo e irreversible producto de situaciones accidentales o agudas como hipertermia, hipoxia o agentes que producen un daño en la membrana [25] y va acompañada de una serie de alteraciones morfológicas y metabólicas hasta la lisis y muerte final. Se caracteriza por un hinchamiento de la célula al ocurrir una entrada indiscriminada de líquido, fragmentación anárquica de la cromatina con ruptura de las membranas nucleares, de los organelos y de la

membrana plasmática, liberándose el contenido intracelular provocando una inflamación exudativa de los tejidos vecinos.

Por otra parte, la muerte celular por apoptosis o también llamada muerte celular programada es un mecanismo clave en la homeostasis celular ocurriendo durante la embriogénesis, la metamorfosis y el recambio de células senescentes. Se ejecuta normalmente durante el desarrollo fisiológico de los organismos eucariontes para suprimir las células innecesarias o para eliminar las células que han sido dañadas por distintos agentes estresantes, tales como la radiación UV o  $\gamma$  [26]. Es un tipo de muerte fisiológica totalmente regulada, donde la célula va desapareciendo poco a poco por autodestrucción programada.



**Figura I-5**: Tipos de muerte celular [27]: Resumen descriptivo de los tipos de muerte celular. Apoptosis (izquierda) y los efectos fisiológicos durante su proceso programado de muerte. Necrosis (derecha), un tipo de muerte no regulado y posterior liberación al medio de contenido intracelular generando inflamación. Autofagia (centro) es un tipo de respuesta fisiológica celular, que en un estado inicial es usado por la misma célula para proveer energía en caso inanición permanente, para en un posterior paso generar muerte celular similar a los estados finales de la apoptosis.

La célula que se suicida se aísla de sus células vecinas ya que pierde sus moléculas de adhesión y luego se desintegra de manera ordenada, este proceso comienza con una disminución del volumen celular este fenómeno está ligado a una pérdida iso-osmótica de agua, con condensación citoplasmática, seguido de alteraciones en la membrana celular con la formación de protrusiones llamadas dedos de guante, luego la cromatina se condensa en la periferia del núcleo, seguida de una retracción del mismo que se atomiza en pequeñas esferas, se produce finalmente la compactación de mitocondrias y otros organelos y formación de cuerpos apoptóticos. Los cuerpos apoptóticos pueden contener material nuclear o no, u otros componentes celulares. Estos cuerpos apoptóticos atraen a los macrófagos (por las moléculas características que aparecen en la membrana), que los fagocitan sin dejar rastros ni producir inflamación. Nunca una célula apoptótica libera moléculas de su interior porque su membrana no se rompe *in vivo*. En células *in vitro* los cuerpos apoptóticos sufren necrosis secundaria [28].

Asimismo, conociendo en detalle el mecanismo de muerte celular puede ser mejorada la terapia de inducción activa de muerte celular en poblaciones de células tumorales, efecto principal de la radioterapia y quimioterapia actuales en búsqueda de tratamientos con menores efectos secundarios [28].

Se ha demostrado que el mecanismo de muerte celular provocado por los fotoproductos de RF y triptofano (o ácido 3-indol acético) cuando son irradiados en solución y adicionados a la célula inducen apoptosis [1, 22]. También se ha visto que el efecto tóxico de la luz visible sobre estas células aumenta si son incubadas durante 24 horas antes de la irradiación con tetrapropionato (RTP) y tetrabutirato (RTB) de RF. La fototoxicidad aumenta drásticamente cuando la irradiación se efectúa en presencia de Trp [29].

En la actualidad han sido descritos tres tipos de muerte celular provocados por procedimientos de PDT: la necrosis, la apoptosis y la muerte celular autofágica o muerte lisosomal. El primero de ellos se caracteriza por una muerte pasiva y aleatoria con vacuolización del citoplasma y lisis celular, la apoptosis es una muerte programada inducida por la activación enzimática de las caspasas (cistein proteasas) con formación de cuerpos apoptóticos y externalización de la fosfatidilserina; mientras que en la autofagia, la formación de autofagosomas

permite el desembalaje celular para la posterior actividad lisosomal y proteosomal, que es favorecida en este tipo de muerte celular [28, 30-35]. La ocurrencia de un tipo de muerte puede depender de diferentes factores relacionados con la ocurrencia de eventos fotoquímicos, se distinguen: las condiciones del tratamiento de PDT (concentraciones del fotosensibilizador y el oxígeno molecular, cantidad de luz empleada), ubicación subcelular del fotosensibilizador y la línea tumoral de estudio. De igual manera los tipos de muerte pueden estar presentes en forma individual, simultánea (en el caso de la apoptosis y la autofagia) y también es factible que interactúen entre sí [35-38]. Por otra parte, el desarrollo de un tipo de muerte bajo condiciones *in vitro* no necesariamente implica que se dé a lugar bajo condiciones *in vivo*; sin embargo, la diferenciación del tipo de muerte predominante bajo determinadas condiciones es de interés terapéutico para su posible predicción, inducción o prevención según sea el caso.

Uno de los métodos para la detección *in-vitro* de diferentes tipos de muerte celular promovidos por la PDT, es mediado por el uso de inhibidores de muerte apoptótica y autofágica. El zDEVD-fmk (bencilocarbonil-Asp(O-Me)-Glu(O-Me)-Val-Asp(o-Me) fluorometil cetona) es un inhibidor específico de caspasa-3, y de uso común para la detección de apoptosis en PDT [37, 38]. Por otra parte, La 3-metil adenina (3-MA) es un bloqueador de autofagia que inhibe la PI3-quinasa, necesaria para la formación de las vacuolas autofágicas [36, 39]. Los fotoproductos generados en las reacciones fotosensibilizadas por la RF y sus derivados flavínicos son altamente citotóxicos pero desde el punto de vista bioquímico, los blancos subcelulares y mecanismos para la inducción de la citotoxicidad no han sido identificados. Por lo que ha sido de nuestro interés enfocar nuestro estudio en ese sentido.

Pese a las condiciones descritas anteriormente, los fotosensibilizadores no se acumulan selectivamente en un 100%, dando una distribución generalizada por el cuerpo humano, especialmente la piel, impidiendo al paciente poder exponerse al sol desde 2 semanas (ZnPc, sensibilizador de 2<sup>a</sup> generación)

hasta por 6 a 8 meses (Photoprin ®, sensibilizador de 1ª generación). En esta tesis se buscará la modificación de los compuestos de RF para que en un desarrollo posterior, estas puedan ser modificados con moléculas bioactivas que aumenten la selectividad en las células blanco.

### I.3 Nanopartículas magnéticas

Las nanopartículas magnéticas, son un tipo de nanopartículas que poseen la característica especial de ser magnetizables. Esto es de gran interés, ya que se les puede inducir un efecto magnético (aplicar energía) desde un medio externo. Es por esto, que existe una investigación intensa en áreas como: fluidos magnéticos, catálisis, biotecnología, biomedicina, obtención de imágenes por resonancia magnética, almacenamiento de información y cuidado medio ambiental.

Para una visión completa de las nanopartículas magnéticas, es necesario recordar los conceptos básicos de ciclos de histéresis, anisotropía y dominios magnéticos[40].

Campo Magnético (H): Es un campo de energía generado en el ambiente, que permite acelerar una carga en el campo.

Magnetización (M): Es la fuerza generada entre dos dipolos (momento magnético o momento dipolar) por unidad de volumen.

Flujo Magnético o Inducción Magnética (B): Es la suma de las influencias del campo magnético (H) y la magnetización (M) del material, más la influencia de la permeabilidad del medio al magnetismo.

Compuestos diamagnéticos: Compuestos que poseen momentos magnéticos negativos, es decir, que en presencia de un imán, son repelidos. Esta energía de repulsión, es de tan bajo valor, que normalmente, se considera que un imán no afecta al compuesto.

Compuestos Paramagnéticos: Compuestos que tienen momentos magnéticos positivos, y que en presencia de un campo magnético externo, se alinean a este.

Compuestos Ferromagnéticos: Son compuestos que espontáneamente (sin presencia de un campo magnético externo) alinean sus momentos magnéticos, permaneciendo constantemente magnetizados.

Dominios magnéticos: Es una región local del material en el cual todos los momentos magnéticos atómicos están alineados en la misma dirección.

Anisotropía magnética: Cuando no hay un campo magnético aplicado, la magnetización del material apunta en una dirección especial del enrejado atómico, dependiente de las características particulares de cada compuesto.

Ciclos de Histeresis: La histéresis magnética, se define como la capacidad de un compuesto ferromagnetico de retener magnetismo cuando se retira el campo magnético que lo ha inducido. Este se representa en el ciclo de histéresis, que es la representación de la magnetización o flujo magnético v/s campo magnético aplicado al compuesto (símil a voltametría cíclica).

Todos los materiales son magnéticos hasta cierto límite, con una respuesta a un campo magnético dependiente de la estructura atómica que posea. Si un material es colocado en un campo magnético de fuerza H los momentos atómicos individuales se alinean con el campo, en el caso que sea paramagnético; un material diamagnético se alinea en el sentido contrario. Cada material paramagnético consta de dominios internos en donde cada dominio tiene una dirección de magnetización partícular, en función de su anisotropía y de la estabilización de todo el conjunto. Como se ve en la Figura I-6, la aplicación de un campo H a un material paramagnético, conlleva la inicial deformación de las paredes de los dominios (proceso reversible), con la consecuente ruptura interna de las paredes de los dominios, para en un último paso, comenzar a fusionarse todos los dominios, para magnetizar el compuesto por completo en dirección de H.



**Figura I-6**: Dominios magnéticos de un compuesto paramagnético o ferromagnético: Un compuesto ferromagnético se componen de dominios magnéticos individuales, que a medida que se le aplica un campo magnético externo, estos se modifican, incluso fusionan para alinearse con el campo externo.

En compuestos ferromagnéticos, la magnetización, no es lineal a medida que se aplica un campo magnético a un compuesto (depende de H). Esto se debe al magnetismo de base que presentan estos compuestos, que puede llegar a tener un M inicial 10<sup>4</sup> veces más grande que compuestos paramagnéticos. En base a las características anteriores, es que los ciclos de histéresis presentan características diferentes, como las que se observan en la Figura I-7.



**Figura I-7**: Ciclo de histéresis de un compuesto ferromagnético: Gráfico que representa como varía la magnetización de un compuesto ferromagnético a medida que se le aplica un campo magnetico externo. Una de las características fundamentales, es que después de modificados los dominios magnéticos, al quitar el campo externo (H=0) el compuesto mantiene una magnetización remanente ( $M_r$ ).

En el punto inicial (0, 0) de la Figura I-7, el compuesto no posee ninguna magnetización (M). A medida que aumentamos H, la magnetización del compuesto aumenta de forma sigmoidea, debido a los cambios internos de dominios (tanto procesos reversibles como irreversibles), para llegar a un punto máximo de magnetización, llamado magnetización de saturación ( $M_s$ ), donde la magnetización del compuesto no aumenta más. Cuando se comienza a disminuir H, la magnetización disminuye, pero siguiendo un recorrido diferente al inicial, y al llegar a H=0, queda una magnetización remanente en el compuesto, denominada M<sub>R</sub>, que es una característica esencial de los compuestos magnéticos que permite la producción de imanes. Siguiendo con la trayectoria, se hace un ciclo y se vuelve a  $M_s$ , donde se pasa por el punto H<sub>c</sub>, que es denominado fuerza coerciva, que es equivalente a la fuerza necesaria para desmagnetizar un compuesto con una Mr. Además, se puede definir  $\chi_i$ , que es la susceptibilidad inicial de un compuesto, que define la diferencia entre compuestos magnéticos duros ( $\chi_i$  baja, o de difícil magnetización inicial) y magnéticos blandos ( $\chi_i$  alta, o de fácil magnetización).

En sustancias ferromagnéticas, la forma de los ciclos de histéresis está determinado por la forma y el tamaño de las partículas. Las partículas grandes tienen varios dominios magnéticos (con sus correspondientes paredes de dominios), por lo tanto, cuando se aplica un H externo el solo movimiento de las paredes de dominios para formar un solo dominio modifica la magnetización en sentido del campo externo. Esto conlleva a que se obtenga un estrecho ciclo de histéresis, es decir, es más fácil magnetizar el material. Cuando se disminuye el tamaño de las partículas, la cantidad de dominios disminuye, hasta un punto crítico (D<sub>c</sub>), donde el tamaño de la partícula es del tamaño de un dominio magnético. En este caso, cuando se aplica un campo externo, no exista la posibilidad de mover paredes de dominio, y la única forma alinear el momento magnético, es rotar este vector, proceso de energéticamente más desfavorable que fusionar dominios, y por lo tanto se obtienen, ciclos de histéresis más anchos, es decir, de más difícil magnetización [8]. Esto se puede observar en la Figura I-8.



**Figura I-8**: Ciclos de histéresis de compuestos ferromagnéticos de diferentes tamaños: Compación ilustrativa de como se compartan los ciclos de histéresis de compuestos ferromagnéticos a medida que se hacen más pequeños en tamaño. Inclusive, al hacerse tan pequeños, como del tamaño de un dominio magnetico, se obtiene el fenómeno físico de superparamagnetismo.

Bajo D<sub>c</sub>, normalmente en el rango de las decenas de nanómetros, la nanopartícula se comporta como un dominio con una sola dirección de magnetización, dependiente de su anisotropía.



**Figura I-9**: Cambio de magnetización de una partícula de dominio único, y magnetización fija (izquierda) y magnetización azarosa (derecha): Pese a que en ambos casos la magnetización de la partícula se alinea con el campo magnético externo H, en ausencia de campo magnético (estado "A" en ambas), este puede quedar fija por el efecto de los dominios magnéticos alrededor (izquierda) u oscilar libremente debido a la auscencia de dominios magnéticos alrededor (derecha).

Como la energía de anisotropía magnética depende proporcionalmente del volumen, hay un volumen crítico, bajo el cual la energía de anisotropía magnética se hace menor que la energía térmica de la partícula.

Cuando la energía térmica de la nanopartícula supera la energía de anisotropía magnética, la magnetización de la partícula oscila azarosamente por la partícula (Figura I-9 derecha). Esto significa, que la partícula deja de ser ferromagnética (con magnetización fija), para pasar a ser paramagnética (magnetización neta 0), pero manteniendo cualidades magnéticas como la de las partículas ferromagnéticas, es decir, tiene una  $M_s$  de alto valor. Este tipo de partículas, son denominadas, partículas superparamagnéticas [41, 42].

En la Figura I-10, se muestra el ciclo de histéresis de una partícula superparamagnética (PSPM).



**Figura I-10**: Ciclo de histéresis de una partícula Superparamagnética: Cuando las particulas, logran tener un tamaño más pequeño que su dominio magnético, su magnetización oscila libremente a una determinada temperatura, y como consecuencia, no tienen magnetización remanente en ausencia de campo externo.

Como se puede observar en la Figura I-10, las partículas PSPM tienen ciclo de histéresis con características del ciclo de histéresis de las partículas paramagnéticas, pero con valores de M<sub>S</sub> similares a los de los compuestos ferromagnéticos.

Las características fundamentales que tienen las PSPM, para aplicación biológica son las siguientes:

La magnetización de las PSPM en ausencia de un campo magnético es 0 (H=0  $\rightarrow$  M=0). Esto permite que las PSPM sean estables en solución, y no se agreguen, por atracción magnética.

La magnetización remanente de las PSPM es M<sub>R</sub>=0. Esto las hace aplicables para entrega de farmacos, debido a que pueden ser atraídas por campos magnéticos a sitios específicos, y luego que se retira el campo magnético, las partículas vuelven a tener magnetización 0, impidiendo la aglomeración en las arterias, y posibles coágulos.

La Magnetización de Saturación es de magnitud similar a la de los compuestos ferromagnéticos, por lo tanto, no se necesitan elevados campos magnéticos para poder ejercer atracción magnética sobre ellas.

El tamaño de las PSPM (del orden de la decenas de nanómetros) permite obtener altas relaciones Superficie:Volumen, permitiendo a la vez, elevadas cargas de sustancias que pueden ser entregadas como agentes terapéuticos. En la actualidad, hay muchos materiales magnéticos disponibles en el mercado, con una muy variada gama de propiedades magnéticas. Sin embargo, muchos de estos, son altamente tóxicos, como el cromo y el cobalto, y por lo tanto, no pueden ser usados en aplicaciones médicas o biológicas. Sin embargo, los materiales basados en óxidos de hierro, como la magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) y la magemita (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), son relativamente seguros, y en la actualidad
son ampliamente usados con propósitos médicos [41, 43-47], como por ejemplo, en imágenes de resonancia magnética nuclear (IRMN). Las PSPM más investigadas en la actualidad son las de magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) debido a su facilidad de producción, estabilización, características magnéticas e inocuidad en su aplicación in-vitro e in-vivo.

#### I.4 Nanopartículas de Silicio

En los últimos años, un número cada vez mayor de publicaciones demuestran la posibilidad de utilizar nanopartículas en PDT [9, 10, 12, 48-55].

Se ha demostrado que las nanopartículas pueden acumularse en el sitio del tumor por endocitosis y paso vascular. Además, las nanopartículas pueden modificarse superficialmente usando una orientación específica (tales como anticuerpos) para la acción específica de la célula blanco. La encapsulación de las drogas en las nanopartículas de Si o en la superficie son fácilmente viables, no tóxicas, químicamente inerte y ópticamente transparente [50, 56-58].

Además de proteger el fármaco de interferencias externas, la matriz de sílice puede mejorar la selectividad del fármaco hacia las células cancerosas al tiempo que reduce su toxicidad hacia células normales, como se ha observado en la hiperpermeabilidad de microvasos tumorales a moléculas grandes [52]. El tamaño de poro de varios modelos vasculares de tumores ha informado que oscila entre 300y 700 nm [41], dando la posibilidad a que nanopartículas (<100nm) puedan tener paso a capas intersticiales de células.

La preparación de partículas de Si cargadas con moléculas puede ser difícil debido a la naturaleza altamente hidrófobica de la molécula orgánicas en comparación con la superficie hidrófila de Si [59]. Debido a esto, modificaciones químicas pueden ser una eficiente solución para poder encapsular fotosensibilizadores en estos nanocompuestos.

Debido a lo anterior, las nanopartículas de Si o cubiertas con este material, presenta grandes ventajas para el transporte de drogas para uso humano [48-50, 56-67]:

- Las nanoartículas de Si mesoporosa, permite agregar grandes cantidades de drogas debido a su alta relación superficie:volumen.
- El Si es considerado inocuo y no tóxico para el uso humano.
- El Si es estable ante diversos ambientes químicos y físicos del cuerpo humano (cambios de pH, temperatura, presión osmótica, etc).
- Gran facilidad de modificación química y/o biológica en su superficie para mayor selectividad en su proyectado uso.

# I.5 Hipótesis

Las flavinas son eficientes fotosensibilizadores. Para una futura aplicación en terapia se propone que:

- 1. La muerte inducida por acción de la luz y flavinas puede inducir muerte celular por mecanismos de apoptosis o autofagia.
- 2. La incorporación a nanopartículas debería mantener las propiedades fotoquímicas y fotofísicas de las flavinas, además de aumentar la estabilidad de la RF, la incorporación y fototoxicidad del tratamiento.

# I.6 Objetivos generales

- 1. Estudiar los mecanismos de muerte celular inducidos por Riboflavina y algunos de sus derivados por acción de la luz en células tumorales.
- 2. Encontrar las condiciones óptimas para incorporar RF a nanopartículas para una futura aplicación en terapia humana o antiinfecciosa.

# I.7 Objetivos específicos

- 1. Evaluar el tipo de muerte celular producido por derivados de riboflavina esterificados.
- 2. Sintetizar y caracterizar física y químicamente nanopartículas superparamagnéticas y de silicio, del orden de los 20 nm.
- 3. Sintetizar un derivado de riboflavina que pueda servir como estabilizante y a la vez como fotosensibilizador.
- 4. Unir fotosensibilizadores a las nanopartículas (magnéticas y sililadas), evaluar estabilidad y caracterización química y física.
- 5. Evaluar propiedades fotoquímicas de las nanopartículas con los fotosensibilizadores.
- 6. Evaluar aplicación de las nanopartículas en células tumorales, realizando experimentos a nivel in-vitro.

#### Capítulo II. Parte Experimental

#### II.1 Materiales, equipos y reactivos

#### II.1.1 Reactivos

Se utilizaron los siguientes reactivos directamente sin mayor purificación. De GIBCO BRL: Tripsina-EDTA, Antibióticos-antimicóticos (PenicillinaG, sulfato de sodio, streptomicina, anfotericina B); De GURR: Azul Trypan; De MERCK : Bromuro 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5 difenil-2H-tetrazolio, NaCl p.a., NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O p.a., NaHPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O p.a., Cloroformo, Etanol, Metanol, Acido Propionico, Anhídrido propionico, Anhídrido butirico, Acido butírico, Acuasol, Acido Perclórico, DL- $(\alpha)$ -Fosfatidil colina, dipalmitoil (DPPC) p.a.; De SIGMA CHEMICAL CO.LTDA.: Dulbecco's Modified Eagle's medium, Riboflavina p.a., Suero fetal bovino, DL-( $\alpha$ )-Fosfatidil colina, dipalmitoil (DPPC) p.a., DABCO: 1,4-Diazabiciclo(2,2,2)octano (DABCO Trietilendiamina); De BDH CHEMICALS LTDA .: L-Triptófano p.a.

#### II.1.2 Disoluciones

Las siguientes disoluciones fueron utilizadas regularmente: PBS 0,1M a pH 7,2 GKN a pH 7,2., medio líquido Dulbecco modificado por Eagle (DME), medio Completo (Medio Eagle modificado por Dulbecco con 10% suero fetal bovino, 1% de antibióticos), aminoácido Triptofano, a 2mM en DME, RF a 200  $\mu$ M en DME, RTP y RTB a 200 $\mu$ M en dispersión de liposomas, Buffer TBE 0,5x (Tris, ácido bórico, EDTA), DABCO: 1,4-Diazabiciclo(2,2,2)octano (DABCO Trietilendiamina).

# II.2 Métodos

# II.2.1 Síntesis de los ésteres de Riboflavina (RF):

Todos los reactivos utilizados en las síntesis son de grado analítico. Todas las síntesis de los derivados flavínicos esterificados se efectuaron según el método modificado de Ogasawara [24].

# II.2.1.1 2',3',4',5'-Tetrapropionato de Riboflavina (RTP).

100 mg de RF fueron añadidos a 10 ml que contenían una mezcla 1:1 de ácido propiónico y anhídrido propiónico, luego fueron cuidadosamente añadidos 0.2  $\mu$ L de HCIO4 al 70%, agitándose la mezcla por 12 h en baño de agua a 50C, enfriándose posteriormente en un baño de hielo y diluyendo con un volumen igual de agua, después se realizaron 3 extracciones con 25 ml de CHCL3, los extractos recolectados son lavados 4 veces con 25 ml de agua desionizada seguido de una extracción con 25 ml de una solución saturada de NaCl. La solución fue evaporada a sequedad y el producto fue recristalizado 4 veces en una mezcla CH3OH: H2O (17:3). El rendimiento experimental fue del 75%.

# II.2.1.2 2',3',4',5'-Tetrabutirato de Riboflavina (RTB).

100 mg de RF fueron añadidos a 10 ml que contenían una mezcla 1:1 de ácido butírico y anhídrido butírico, luego fueron cuidadosamente añadidos 0.2 μl de HCIO4 al 70%, agitándose la mezcla por 24 h en baño de agua a 50C, enfriándose posteriormente en un baño de hielo y diluyendo con un volumen igual de agua, después se realizaron 3 extracciones con 25 ml de CHCL3, los

etractos recolectados son lavados 4 veces con 25 ml de agua desionizada seguido de una extracción con 25 ml de una solución saturada de NaCl. La solución fue evaporada a sequedad y el `producto fue recristalizado 4 veces en una mezcla CH3OH: H2O (17:3). El rendimiento experimental fue de un 65%.

Estos derivados fueron caracterizados por espectroscopia H-RMN; fluorescente y de absorción [24].

#### II.2.2 Cromatografía en capa fina.

Para la identificación de todos los derivados, se utilizó una mezcla de corrida CHCL3: CH3COOH glacial: CH·OH (18:1:1).

Las placas para cromatografía sobre Al utilizadas, contiene sílica gel n 60 F254. Se utilizó una lámpara UV marca GALLENHAMP LCF-870-R, para visualizar el Rf de las flavinas sintetizadas.

#### II.2.3 Espectros

Los espectros de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 (con lector de placa multipozo), la  $\lambda$ ex. de las flavinas es a 450 nm y la  $\lambda$ em es a 520nm.

Los espectros de absorción se realizaron en un espectrofotómetro Hewlet Packard 8453, con arreglo de diodos. Las mediciones de absorbancia en placas multipozo se efectuaron en un lector de placas multipozo.

Los espectros IR se obtuvieron en un equipo Bruker, IR VECTOR 22 y los espectros de RMN en un espectrómetro Bruker AC-300P.

Se utilizó un lector de placas Biotek, Sinergy HT para las mediciones de muestras (absorbancia o fluroescencia) cuando el número de muestras fuese muy alto o en condiciones biólogicas de esterilidad.

#### II.2.4 Síntesis y caracterización de RF-Si4

A 0,27 mmol de riboflavina, se añadieron 1,2 mmol de isocianato de 3-(trietoxisilil) propilo en 50 ml de DMF seco en presencia de 250 µl de trietilamina (Et<sub>3</sub>N). La reacción se realizó a 70°C durante 48 h en una atmósfera seca saturada de N<sub>2</sub> en la oscuridad. Obsérvese que el producto RF-Si4 mostró una buena solubilidad en disolventes orgánicos como el cloroformo, algo que también indica la modificación real de la cadena de ribitil.

#### II.2.5 Síntesis de la nanopartícula de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

La formación de las nanopartículas se realizó mediante el proceso de coprecipitación. Se mezclaron 0,3 g FeSO<sub>4</sub>, y 0,62 g de NH<sub>4</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> en agua destilada, bajo ambiente de N<sub>2</sub>, y la temperatura se eleva a 80 °C. Se agitó la solución a 30.000 rpm, y se agregó NH<sub>4</sub>OH. Se esperó 30 minutos con agitación constante y ambiente de nitrógeno.

Se implementó un sistema domestico para la obtención de las revoluciones requeridas para la coprecipitación, que se muestra en la Figura II-1.



**Figura II-1**: Implementación domestica de agitador de altas revoluciones: Rotor marca Dremmel® con una adaptación de acero inoxidable de 5 mm de espesor y 7 cm de largo. Esto permite agitaciones de 30.000 rpm.

#### II.2.6 Síntesis de RF-Si4@Si

En general para cualquier recubrimiento de silicio, se utilizó el procedimiento de Stöber [68]. En resumen, se añadieron 640 mg de IGEPAL-CO a 10 ml de ciclohexano y se sonicaron durante 10 minutos en sonicador Transsonic 310, marca Elma. Se añadió en función de la cantidad necesitada por experimento de RF-Si4 (1,0 mg / ml en tolueno), 136 µl de NH4OH y 110 µl de TEOS y luego se dejó agitando durante 16 horas en la oscuridad. La solución se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos y después se lavó con 5,0 ml de metanol, este procedimiento se repitió tres veces. Las partículas y el RF-Si4 no incorporado se lavan en la fase metanólica. El producto se aisló por centrifugación (8000 rpm, 10 min) y después se lavó con metanol hasta que no se detectó RF-Si4 en el UV-Vis. Las muestras de control preparadas sin RF-Si4 se prepararon siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente. Mediciones de la RF-Si4 no unida en la fase metanólica es  $\approx$  20% de la concentración inicial del colorante que se incorpora en las nanopartículas.

## II.2.7 Caracterización física de los nanomateriales

RF-Si4 @ NP se caracterizó usando un microscopio de barrido de superficie (SEM) JSM-7500F de Jeol Ltd. Las muestras de SEM se prepararon depositando 10 µl de la suspensión de nanopartículas sobre una rejilla de Cu y secándose bajo vacío en un desecador durante 24h. La suspensión de las nanopartículas se caracterizó también por el uso de dispersión dinámica de la luz en un Malvern Zetasizer Nano ZS a 20°C en cuvetas de 1,0 cm de trayectoria desechables.

#### II.2.8 Liposomas

Se prepararon liposomas unilaminares utilizando el método de inyección de Kremer [69], usando una razón fosfolípido/ etanol de 10 mg/ ml, esta solución es añadida gota a gota a un volumen determinado de medio acuoso tamponando (DME) con una relación etanol: tampón (0,5:10), a 56°C con agitación vigorosa. Se utilizó como medio acuoso tamponado el medio de cultivo celular Dulbecco modificado por Eagle (DME) y los esteres de RF (RTB y RTP) se disolvieron en la solución etanólica del fosofolípido dipalmitoilfofatidilcolina.

#### II.2.9 Cultivos celulares.

Células HL-60 (leucemia humana) y Hela (carcinoma de útero humano) fueron cultivadas a 37°C, 10% CO2, 100% de humedad en medio mínimo Eagle modificado por Dulbecco (DME) enriquecido en glucosa y suplementado con suero fetal de bovino, aminoácidos no esenciales, antibióticos (streptomicina y penicillina ) y antimicóticos en Incubadora con atmósfera de CO<sub>2</sub>, Hera Cell,

modelo SORVALL Heraeus. Se utilizaron placas de cultivo multipozo según el método descrito en Edwards, *et al.*,[2]. Para los ensayos se adicionó el o los compuestos a estudiar disueltos en el medio de cultivo. Los compuestos hidrofóbicos se adicionaron al medio incorporados a liposomas. El efecto se observó directamente en la placa de cultivo en un Microscopio invertido equipado para contraste de fase, modelo Axiovert 25, Zeiss, equipado con contrate de fase. Todos los experimentos se realizaron en condiciones de máxima esterilidad trabajando bajo una campana de flujo laminar horizontal modelo EQU/03-EHC, Esco, con material estéril desechable.

Para esterilizar todos los materiales ocupados se utilizó una autoclave eléctrica de 22L, Wisconsin Aluminum Foundry.Co., Inc. Model 25X. Cada ciclo, se cargaba con productos a sterilizar hasta máximo de 75% de su capacidad, en el cual se realizaban ciclos húmedos de 30 minutos a 121 °C.

#### II.2.10 Viabilidad celular.

# II.2.10.1 Ensayo de Viabilidad celular por exclusión de Azul tripán.

Se empleó como criterio rápido de viabilidad la exclusión por la tinción vital, azul tripán, contando el número de células viables (aquellas que no aparecen teñidas de azul) en una cámara contadora de Neubauer en un microscopio invertido Zeiss, este método se basa en que se tiñen de azul las células que han perdido la selectividad de la membrana [70].

La determinación del número de células es fundamental para preparar soluciones con una densidad celular requerida, se realizó tomando una muestra de 500 µL de un cultivo patrón (las células HeLa son previamente tripsinadas), a la cual se agregó un volumen igual de azul trypan (azul trypan 0.4% en PBS) con el objetivo de teñir las células muertas. De la solución resultante se toman 16 µL que luego se adicionan a una placa contadora de

Neubauer y se observa al microscopio para proceder a contar aquellas células que no se encuentren teñidas de azul. El factor de conversión es de  $1*10^4$  células/mL (además de multiplicar por la dilución). Se consideró el conteo en duplicado con una diferencia de  $\pm 4$  para todo el campo.

# II.2.10.2 Ensayo colorimétrico para cuantificar la viabilidad celular (MTT)

Los resultados de toxicidad de los experimentos de irradiación fueron cuantificados espectrofotométricamente usando el ensayo de viabilidad de MTT (3-(4,5-dimetil-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromide, tiazol blue) según Mosmann [71]. En la Figura II-2 se muestra la reacción del MTT, brevemente el anillo de tetrazolio es cortado por acción de las deshidrogenasas en mitocondrias activas y convertido en formazan (cristales azules); por tanto, la reacción ocurre solo en células vivas. Se cuantificó la viabilidad utilizando un espectrofotómetro lector de placas multipozo.





En una placa de cultivo (96 pocillos) se agregó 10 µl de una solución de MTT de concentración 5 mg/mL en PBS para 100 µl de solución de células HL-60 o HeLa (ya tripsinadas 300 µl de Tripsina al 10% en GKN y 700 µl de DME). Se

Incubó durante 4 horas a 37°C. Terminado el tiempo donde la reacción se lleva a cabo, ésta se detuvo con 100  $\mu$ l de una solución de HCl al 0.04 N en isopropanol p.a. Se homogenizan los pocillos y se lee en un espectrofotómetro con lector de placas multipozo a una longitud de onda de 570 nm con una referencia de 690nm.

Se usa como blanco 100  $\mu$ l de DME con 10  $\mu$ l de MTT y 100  $\mu$ l de HCL 0.04N en isopropanol.

#### II.2.10.3 Tratamiento con Tripsina de células HeLa.

Del pocillo de células, se descarta la disolución sobrenadante de MC y se lava tres veces con solución tampón de GKN. Posteriormente se agregan 5mL de tripsina-EDTA 10% y se incubaron durante 5-10 minutos a 37°C para permitir que la tripsina actúe y se separen las células. Pasado dicho tiempo se detiene la reacción con 5mL de medio completo (MC). (El medio de cultivo completo contiene 10% de suero fetal de bovino que contiene inhibidores naturales de tripsina).

# II.2.11 Estudio de incorporación de los fotosensibilizadores.

La incorporación de las flavinas a las suspensiones celulares se realizó en el medio de cultivo enriquecido con los esteres RTB, RTP, según la concentración final deseada por pocillo ( $0.5*10^6$  cel/pocillo). Después de 6,12, 24 h de incubación a 37C, 10% CO2 y 100% de humedad, las células son lavadas dos veces con PBS. Después son incubadas toda la noche con un detergente (SDS) en agitación. La concentración de las flavinas se determinó espectrofluorométricamente. La emisión fluorescente característica de las flavinas se midió a una  $\lambda$ em=525nm y utilizando una  $\lambda$ ex= 450, la

concentración de las flavinas se calculó por interpolación con una curva estándar para cada derivado.

#### II.2.12 Sistema de irradiación.

Las irradiaciones de las células se efectuaron directamente sobre placas de cultivo multipozo de 24 pocillos donde se crecieron las células HL-60 en suspensión y HeLa (hasta formar la capa confluente). Se irradió con luz visible utilizando una lámpara con ampolleta de luz blanca de 60 watts. durante 2h a una intensidad de 40 Jm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> medida con Radiómetro YSI-KETTERING Modelo 65 A, según el método descrito por Edwards *et al.*, [2]. En el caso del experimento de la Figura III-42, se utilizó un sistema de irradiación Luzchem LED-L16, con una dosis de luz azul incidente que se describe en la Figura III-42.

# II.2.13 Experimentos de irradiación.

# II.2.13.1 Células HL-60.

Una solución de densidad celular de  $0.25 \times 10^{6}$  cel/mL se sembró por pocillo y se le incorporan 200 ul de las flavinas (RF en DME y RTB o RTP en liposomas de concentración (200uM)) y 100 µL del aminoácido (Trp) en solución de 2mM completándose con 200 µl de DME, (concentración de flavinas de 80 µM y del trp 400 µM, por pocillo). Se incubaron por 6 o 12 horas, a continuación, se irradiaron durante 2 horas con luz visible a 40 Jm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, se alimentan posteriormente con 500 µl de DME y se incubaron por 6, 12 o 24 horas para

cuantificar la viabilidad celular mediante el método del MTT. El volumen final en cada pocillo de placa de cultivo correspondió a 1000µL.

#### II.2.13.2 Células HeLa.

Previa tripsinación de las células y posterior cuantificación se siembran  $0.25 \times 10^{6}$  cel/mL por pocillo. Se incubaron en DME durante 24 horas para permitir el crecimiento normal de las células formando una capa confluente. A las 24 h se enriquecen los medios con 100µL del aminoácido (Trp) en solución 2mM y 200µL de una solución de flavinas (RF, RTB o RTP) de concentración 200 µM, se completa con 200 µl de DME, (concentración de flavinas de 80 µM y del Trp 400 µM, por pocillo) se incubaron durante 6h y a continuación se irradiaron durante 2 horas para alimentarlas posteriormente con 500 µl de DME e incubarlas por 12 horas para cuantificar la viabilidad celular mediante el método del MTT. El volumen final en cada pocillo de las placas fue de 1000µL.

# II.2.14 Microscopía de fluorescencia.

El ensayo se realizó en células HeLa que fueron sembradas en un porta objeto que se colocó en una placa petri con medio, y crecidas durante 4 dias hasta que la capa comenzara a ser convergente y cubriera todo el cubre objeto, las flavinas fueron adicionadas a muy altas concentraciones (500  $\mu$ M) durante 4 h después se lavaron 5 veces con PBS y se observaron al microscopio de fluorescencia.

La preparación de las muestras se realizó montando cada cubre con las células crecidas hacia abajo sobre un portaobjetos con medio de montaje DABCO para fluorescencia.

# II.2.15 Microscopía electrónica de trasmisión.

Las células HL-60 fueron colectadas por centrifugación a baja velocidad por 10 min. Las células HeLa fueron previamente incubadas con tripsina-EDTA por 4 min a temperatura ambiente. Las células fueron fijadas con glutaraldehido al 2 % en buffer cacodilato 0,1 M pH 7,4, se post-fijan con OsO4 al 1%, se deshidratan con acetona, y se incorporan a Epon. Cortes finos (400-500 A) son teñidos con acetato de uranilo al 4 % en metanol y citrato de plomo [2]. Se observaron en un microscopio electrónico Phillips TECNAI 12 de la Unidad de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

# II.2.16 Experimento de Anexina V-FITC y Yoduro de Propidio

Este experimento fue realizado siguiendo las instrucciones del fabricante (BD Biosciences). 5  $\mu$ L de Anexina V-FITC y 10  $\mu$ L de Yoduro de Propidio (PI) fueron agregados a 100  $\mu$ L de células tratadas o control (1\*10<sup>6</sup> células/mL). La disolución fue suavemente agitada e incubada por 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, para luego agregar 400  $\mu$ L de tampón de unión (disolución provista por el fabricante BD Biosciences). Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo después de 1 hora.

# II.2.17 Citometría de Flujo

Muestras de 20.000 células fueron analizadas utilizando el citómetro de flujo FACscan Beckton Dickinson. El software utilizado fue Fluorescence Activated Cell analysis Lysys II (Laboratorio de Inmunología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile). La fluorescencia fue detectada con el canal FL1 equipado con flitro de 500-550 nm para la medición de la Anexina V-FITC y el canal FL2 equipado con filtro de 550-600 nm para la detección de Yoduro de Propidio.

# II.2.18 Caracterización fotofísica de RF-Si4 y nanopartículas de RF-Si4@Si

Los espectros de absorción fueron llevados a cabo en el espectrofotómetro UV-Visible Cary-100 usando una cubeta de Quarzo de 1x1 cm. Las medidas de emisión de fluorescencia fueron llevadas a cabo en el espectrofluorímetro Photon Technology International (PTI) a temperatura ambiente. Espectros de emisión fueron medidos a velocidad de 1000 nm/min para evitar fotodegradación de las moléculas. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia fueron calculados a partir de la integración del espectro de emisión del compuesto de referencia y el que se desea medir, y expresado como área bajo la curva (ABC). Estos datos permiten calcular el rendimiento cuántico de fluorescencia ( $\Phi_{FL-MUESTRA}$ ) de la siguiente manera:

$$\Phi_{FL\_MUESTRA} = \Phi_{FL\_RF\_EtOH} \left( \frac{\left[ \frac{AUC_{MUESTRA}}{\overline{A_{450nm\_MUESTRA}}} \right] \times \eta^2_{MUESTRA}}{\left[ \frac{AUC_{RF\_EtOH}}{\overline{A_{450nm\_RF\_EtOH}}} \right] \times \eta^2_{RF\_EtOH}} \right)$$

**Ecuación II-1**: Ecuación que permite el cálculo del rendimiento cuántico de fluorescencia de una muestra problema.

De la Ecuación II-1, se aplica que  $\Phi_{FL\_RF\_EtOH} = 0,32$  [73]. Medidas de tiempos de vida de fluorescencia fueron medidos con el equipo Easy-Life (de PTI) usando pulsos de excitación de LED de 350 nm y la vida media calculada con el software provisto por el mismo equipo.

## II.2.19 Mediciones resueltas en el tiempo.

Las medidas de fluorescencia resueltas en el tiempo fueron llevadas a cabo utilizando un sistema Easy-life el cual tiene como fuente de excitación un LED (light-emitting diode) a 355 nm. Los espectros de absorción de los transientes se registraron en un sistema de laser flash fotolisis LFP 111.

#### II.2.20 Medidas de la fosforescencia de oxígeno singlete.

La fosforescencia de oxígeno singulete fue registrada a 1270 nm después de la excitación de las moléculas en estudio. Se empleo un detector Peltier-cooled (-62.8°C) Hamamatsu NIR operando a -730 V acoplado a un sistema computarizado de control de monocromadores. Los resultados fueron procesados en un software Luzchem Research LFP-111.

Las mediciones de la sección III.4 fueron realizadas en el Centro para la Investigación de Catálisis e Innovación, Departamento de Química, Universidad de Ottawa (Canadá).

#### II.2.21 Oxidación de proteínas

En todos los casos, se irradiaron soluciones de tampón fosfato 10 mM pH 7,4 que contenían 50 µM de albúmina de suero humano y el derivado de RF en un fotorreactor controlado por ordenador CCP-4V (Luzchem®, Ottawa, ON, Canadá) con 14 lámparas UVA para intervalos de tiempo incrementales. A cada intervalo de tiempo, se tomaron alícuotas de 100 µL de solución y se almacenaron a -80°C en la oscuridad para sus análisis posteriores: peróxidos o carbonilo. Las mediciones del consumo de oxígeno también se llevaron a

cabo usando un electrodo de oxígeno MI-730 mM Bedford (Microelectrodes, Inc.) y se evaluó el efecto de la azida sódica y el óxido de deuterio.

#### II.2.22 Peróxidos

Se determinó el contenido de peróxido total usando un Peroxo-Quant colorimétrico (de Thermo Scientific), que se basa en la oxidación de Fe (II) / (III) tras la reacción de Fenton con los peróxidos. El complejo de Xilenol naranja / Fe (III) resultante produce una nueva absorción medida a 595 nm [74] en un lector de microplacas, que es proporcional a una concentración dada de peróxidos.

#### II.2.23 Carbonilos

La oxidación de proteínas se estudió usando un kit de ensayo colorimétrico de proteína carbonilo, que se basa en la reacción entre 2,4-dinitrofenil-hibrazina (DNPH) y carbonilos de proteína. La DNPH reacciona con carbonilos proteicos formando una base de Schiff para producir la hidrazona correspondiente, que puede analizarse espectrofotométricamente midiendo su absorbancia a 370 nm [75].

## II.2.24 Oxidación de dihidroetidium

Para esta medición, se emplearon 20  $\mu$ M de dihidroetidium como sensor de formación del radical superóxido [76, 77]. Las muestras se irradiaron utilizando un sistema LED de 465 ± 10 nm equipado con un conjunto de lentes que permitían expandir homogéneamente el haz de LED y darle una forma rectangular como se ve en la Figura II-3. Se detectó la emisión de fluorescencia

a una excitación de 518 nm y se registró entre 525-690 nm con una velocidad de exploración de 600 nm / min en un fluorómetro LS-50 Perkin Elmer.



**Figura II-3**: Adaptación óptica para homogeneidad del haz de irradiación: Montaje óptico para homogeneidad del haz de luz. Debido a que los LED tienen dispersión de luz, esta luz se enfoca en un punto para aumentar la dosis y homogeneidad de energía que recibe la muestra.

#### Capítulo III. Resultados y Discusión

#### III.1 Muerte celular inducida por riboflavina

Nuestro laboratorio ha investigado por años la riboflavina (RF), en el ámbito de la fotoquímica. Resultados previos indican que es un fotosensibilizador eficiente de mecanismo mixto, tipo I y II, y que su acción se ve potenciada en la presencia del aminoácido esencial triptófano (Trp) [22, 78].

Un problema que presenta RF como fotosensibilizador es su rápida fotodegradación al ser irradiado con luz azul, blanca o UV. Nuestro laboratorio ha reportado la esterificacion de la cadena ribitil de RF con ácidos carboxílicos de diferentes largos de cadena, caracterizando los derivados tetra acetato (RTA), tetra propionato (RTP) y tetra butirato (RTB) de RF, demostrando un aumento en la estabilidad fotoquímica de estos derivados [24]. Las estructuras de estos compuestos se muestran en la Figura III-1.



**Figura III-1**: Molécula de Riboflavina y sus derivados: A la izquierda se muestra la molécula de riboflavina. A la derecha se muestra la molécula de riboflavina modificada en la cadena ribitil.

Se estudió las propiedades de estos compuestos para ser utilizados como fotosensibilizadores en células tumorales humanas, utilizando como modelos célulares HL-60 de la línea mieloide (leucemia) y HeLa de carcinoma cervical, el segundo cáncer más común en mujeres jóvenes.

La incorporación del fotosensibilizador es un factor importante, ya que puede determinar el tipo de daño que genere desde el interior de la célula. En una primera etapa se estudió la incorporación de estos compuestos a células HL-60 determinando la emisión fluorescente característica de las flavinas ( $\lambda$ ex= 450 nm;  $\lambda$ em = 520 nm). Los resultados se muestran en la Tabla III-1, donde se observa que, al aumentar la liposolubilidad, expresada como el reparto octanol agua, aumenta la incorporación de los compuestos a las células, y que consecuentemente los esteres RTP y RTB son los que presentaron la mayor incorporación. Estos resultados concuerdan con trabajos previos de nuestro grupo en el que se observó que un aumento en la liposolubilidad favorecía la incorporación a tejidos de ratón [24].

Flavinas	nmol Flavinas / 10 <sup>6</sup> células	Distribución Octanol / Agua
RF	7.3*10 <sup>-3</sup>	0.11
RTA	9.7*10 <sup>-3</sup>	3.6
RTP	2.11*10 <sup>-2</sup>	18
RTB	8.59*10 <sup>-2</sup>	27

**Tabla III-1**: Incorporación de diferentes derivados de riboflavina en células tumorales: Nombre de las flavinas respecto a la Figura III-1. Cantidad de compuesto respecto a 1\*10<sup>6</sup> células.

Para los esteres que presentaron la mayor incorporación, TRP y TRB, se estudió el efecto de la concentración en la incorporación en células HL-60 y HeLa. Los resultados se muestran en la Figura III-2. Se debe notar que la escala de la Figura III-2A (células HeLa) está amplificada 17 veces respecto a la 2B (células HL-60). Esta mayor incorporación de ambos compuestos a las células HL-60 puede deberse a que crecen en suspensión y tienen mayor superficie de contacto con las flavinas durante la incubación que las células

HeLa, que crecen en monocapa. Para ambas células se observa que la incorporación de RTB es considerablemente mayor que la de RTP, por lo que este estudio se centró en RTB.



Figura III-2: Incorporación de RTB y RTP a diferentes concentraciones: Incorporación de las diferentes flavinas a diferentes concentraciones en 2 tipos de lineas

celulares: HeLa (A) y HL60 (B). Las flavinas se incorporan por 6 horas y se mide la cantidad incorporada en mmol de flavina por cada  $1*10^6$  células.

Se estudió el efecto de la irradiación con luz monocromática azul ( $\lambda$  = 452 nm) sobre las células HL-60 y HeLa a las que previamente se había incorporado distintas concentraciones de RTB. Se incorporó también las mismas concentraciones de RTB conteniendo Trp 0,8 mM cada una, para comprobar si el efecto potenciador reportado para este aminoácido se manifiesta en estas células tumorales [2, 79]. Los resultados se muestran en la Figura III-3.



**Figura III-3**: Viabilidad celular de células tumorales irradiadas con fotosensibilizador: Efecto de la concentración de RTB, con y sin Trp, en células HeLa (A) y HL60 (B). El efecto fue medido después de incorporar por 12 horas y evaluada la viabilidad celular 12 horas post-irradiación por el método de MTT. El análisis estadístico indica (\*\*\*) P<0,001 en ANOVA de dos vías para todas las muestras (excepto 0 µM).

Se observa que en ambos tipos de células el efecto de la luz provoca una importante disminución en la viabilidad, que no se ve afectado por la presencia de Trp en estas condiciones. Se incluye los resultados para los controles oscuros (sin irradiar) en los que se observa un efecto dosis respuesta no despreciable para las células HL-60. Esto puede estar relacionado con la considerable mayor incorporación de RTB en estas células, y por ello se tuvo la concentración de 40 µM como límite máximo de concentración de RTB en células HL-60.

Habiendo determinado que RTB es tóxico por acción de la luz, es importante desde el punto de vista de una aplicación en terapia fotodinámica, estudiar el tipo de muerte celular que inducen los compuestos cuando actúan como fotosensibilizadores. La ventaja de provocar muerte celular por apoptosis sería evitar la inflamación en la zona de tratamiento y así disminuir los efectos secundarios en una aproximación de tratamiento a futuro en terapia. Por la muerte celular del tipo necrosis, si bien genera mayor inflamación, puede generar un efecto más drástico que favorezca el tratamiento.

Para la determinación del tipo de muerte celular se realizaron diferentes experimentos del punto de vista cualitativo y cuantitativo usando células HL-60 HeLa. Estudios previos habían demostrado la generación de apoptosis después que estas células fueron irradiadas con luz azul en presencia de RF y RTB, por la actividad de caspasa 3 y la característica fragmentación tipo nucleosómica del DNA [18, 24].

Para obtener información respecto al porcentaje de células que sufren muerte celular por apoptosis, se realizó experimentos de citometría de flujo con marcadores específicos de apoptosis y necrosis. Esta técnica permite cuantificar el número de células que tiene unido cada marcador fluorescente. Como marcador específico para apoptosis se utilizó Anexina V-FITC, que reacciona específicamente con fosfatidilserina, fosfolípido que se expone al medio extracelular en los procesos apoptóticos. El marcador utilizado para observar muerte celular por necrosis fue yoduro de porpidio, que se une al

ADN, y que solo ingresa a la célula si hay daño en la membrana celular, pero cuando está intacta, como durante la apoptosis, no habrá señal en la región del rojo ( $\lambda$  em = 617 nm).

El máximo de emisión fluorescente de la Anexina V-FITC es 520 nm, que coincide con el máximo de emisión de las flavinas (RF, RTP y RTB). Fue necesario repetir estos experimentos muchas veces para buscar las condiciones que permitieran evitar lo más posible la interferencia de la auto fluorescencia de las flavinas. Finalmente, se determinó con los controles correspondientes cual sería la fluorescencia base para analizar los resultados con los marcadores de Anexina V-FITC y del yoduro de propidio. Además, se tuvo que fltrar los grupos de células correctas que correspondían a las condiciones control mediante los canales FSC y SCC.

Por lo que en la Figura III-4 se incluyen las señales de autofluorescencia. Se muestran los experimentos realizados con células HL-60, en presencia de RTP, RTB y Trp.







e (RTB-Trp Oscuro)



100.00
85.93
13.27
0.34
0.46

g (RTP Oscuro)

d (RTB Luz)



	- % OF VIS
All events	100.00
Left Bottom	71.87
Right Bottom	27.02
Left Top	0.71
Right Top	0.40

f (RTB-Trp Luz)



All events	100.00
Left Bottom	53.89
Right Bottom	35.00
Left Top	9.33
Right Top	1.79

# h (RTP Luz)



**Figura III-4**: Citometría de flujo de células HL-60 en presencia de RTP y RTB: Las células fueron tratadas con los compuestos flavínicos, irradiadas y analizadas 6 horas post-irradiación. Las células fueron incubadas con anexina V-FITC y Yoduro de Propidio. Las diferentes condiciones de irradiación y oscuridad se muestran en cada gráfico. Debido a la propia fluorescencia de los compuestos flavínicos, mediciones para establecer lineas bases fueron aplicadas. Debajo de cada figura, se muestra la abundancia relativa (%) de cada población según la posición de cada cuadrante.

El análisis de los resultados de la citometría de flujo para las células HL-60, muestra que el efecto sin compuesto (Figura III-4 a-b) no afecta la proporción de células en el cuadrante inferior izquierdo, que correspondería al grupo celular sin fluorescencia de Annexina-V y PI. Al comparar la imagen c y g podemos observar que el cuadrante en condiciones oscuras se encuentra en posiciones diferentes. Cuando tenemos RTP en condiciones oscuras, la fluorescencia del RTP se encuentra más a la izquierda comparado con el RTB, lo que se coindice con los experimentos de absorción de los compuestos. El valor promedio de la fluorescencia (U.A.) en el canal de la Annexina en el cuadrante inferior bajo es de 16,56 para RTP en oscuro comparado con 98,80 de la RTB en oscuro.

Respecto al experimento de RTB oscuro, se puede observar en el cuadrante inferior derecho un valor de 12,88% respecto al total, lo que indica que el compuesto de por sí es tóxico en oscuridad. Esto se correlaciona con los experimentos de citotoxicidad, en donde se observan valores que fluctúan mayores al sobre el 90% de viabilidad celular en condiciones oscuras. Al irradiar las células en presencia de RTB se observa un aumento de más del doble de población comparado con su respectivo oscuro en el cuadrante inferior derecho (de 12,88% a 27,02%) indicando un aumento del porcentaje de muerte por apoptosis. Similares condiciones se observan para la condición de RTB-Trp (Figura III-4 e-f) en donde aumenta desde 13,27% a 35,00%. Este aumento cercano al triple de muerte por vía de apoptosis es coincidente con los experimentos de viabilidad en donde se demuestra el aumento del efecto citotóxico en presencia de triptófano en la disolución.

Cabe destacar, que un porcentaje de las células se posicionan en el cuadrante superior izquierdo y derecho, indicando un aumento de la fluorescencia del PI, indicador de necrosis que puede ser explicado por un estado tardío de necrosis secundario posterior a los procesos de apoptosis. Especialmente en la condición de RTB-Trp, este aumento de población desde 0,80 (0,34+0,46) hasta 11,12 (9,33+1,79) indica claramente este efecto.

Respecto a la Figura III-4 g-h en la condición de RTP se puede observar un elevado porcentaje de la población en condiciones de apotosis (25,29%) explicado por la muerte generada por fotosensibilizador en oscuridad. Pese a lo anterior en condiciones de irradiación con luz el aumento de la población en condición de apoptosis aumenta al doble, similar a la condición con el compuesto de RTB.

En la condición de RTP con triptófano, se observa un aumento del doble en la población en condición de apoptosis, un efecto esperado comparado con los experimentos viabilidad, pero en menor grado respecto a la condición de RTB-Trp, algo esperado respecto a la absorción del compuesto de RTP comparado con RTB.

Se realizaron experimentos de microscopía electrónica de transmisión (TEM), para observar el efecto en la morfología celular después de irradiar las células tumorales con luz azul en presencia de RTP, RTB con y sin Trp. Se incluye células irradiadas con RF y los respectivos controles. Los resultados se muestran en la Figura III-5.

Como se observa en la Figura III-5, tanto las células de HL-60 (A) y HeLa (B), manifiestan alteraciones a nivel nuclear y citoplasmático. Algunos de ellos son similares a las descritas en el caso de las células apoptóticas. Las células muestran progresiva ruptura de membrana nuclear y separación de cromatina a la periferia y como consecuencia la formación de cuerpos apoptóticos (flechas indicativas en Figura III-5). En las células HeLa el característico desorden citoplasmático es evidente (Figura III-5 B[D a I]). Además, alteraciones morfológicas a la mitocondria ocurren al mismo tiempo. Las células control muestras una normal morfología mitocondrial, en donde la membrana interna forma la característica cresta mitocondrial que se desplaza hacia el interior del organelo (Interior Figura III-5AA). En contraste, las células tratadas con RTB en presencia de Trp, muestra que el espacio mitocondrial aumenta y las crestas disminuyen. Destaca en las imágenes de las células irradiadas la profusa presencia de vacuolas citoplasmáticas no son atribuibles a cuerpos apoptóticos (Ejemplo Figura III-5 AH y BD). Esta evidente formación de vacuolas indica la posibilidad de la aparición de un nuevo mecanismo de muerte celular, adicional a la apoptosis, conocido como autofagia, que ha sido descritas previamente en otros tipos de terapia fotodinámica [18, 30, 33, 37], y que se caracteriza por una extensa formación vacuolar.

Debido al estudio avanzado del tipo de muerte celular, la apoptosis celular se podría derivar en un tipo de muerte programada llamada autofagia, la cual se caracteriza por una muerte celular caracterizada por la formación de vacuolas celulares similares al proceso de ayuno metabólico celular.

En la Figura III-6 se amplifican algunas imágenes para observar mejor los cambios característicos de mecanismos autofágicos debido a la formación de vacuolas.



**Figura III-5**: Microscopía electrónica de células tumorales con flavinas: se muestran células HL60 (A) fijadas 12 horas post-irradiación después de haber sido incorporados los diferentes compuestos flavínicos. Las células HeLa (B) fueron fijadas 12 horas post-irradiación en las diferentes condiciones. Las flechas y puntas de flechas indican formación de cuerpos apoptóticos en la célula.



**Figura III-6**: Microscopía electrónica, ampliación de zonas afectadas por irradiación: Ampliación de células HL60 (A) y HeLa (B) después de fijadas 12 horas post-irradiación. Se amplía las zonas donde se observa gran formación de vacuolas, las cuales se puede observar que tienen doble membrana y contenido interno dentro de las vacuolas.

En las células irradiadas se observa regiones con vacuolización evidente (Figura III-6) y la formación de estructuras de doble membrana en formación, y dilatación de las mitocondrias. Se observan vacuolas citoplasmáticas que contienen material membranoso y gránulos densos (Figura III-6 Ac' y 6Bc',

para células HL-60 y HeLa, respectivamente) características de autofagia [28, 35, 39]. El efecto es mayor en las células tratadas con RTB con respecto a las células tratadas con RF (Figura III-6 Ac, Bc y Ab, Bb, respectivamente).

Para obtener más información sobre los mecanismos de muerte celular involucrados en nuestro sistema, se irradiaron células HL-60 en presencia de RTB, con y sin la adición de 10 mM de 3-metiladenina (3-MA), compuesto que actúa como inhibidor de autofagia [30]. Las células irradiadas en presencia de RTB y 3-MA mostraron un efecto 42% menor en la disminución en la proliferación con respecto a las irradiadas en presencia de RTB (datos no mostrados).

En la Figura III-7 se muestran las imágenes de epifluorescencia utilizando Lysotraker red, marcador que emite fluorescencia en el rojo cuando se incorpora al medio ácido de lisosomas y/o vacuolas [37].

	WITHOUT 3-MA	WITH 3-MA
MC (-)	A 20 µm	B 20 µm
MC (+)	С 31 иг	
RTB (-)	E 20 µm	20 µm
RTB (+)	G zo µm	H
RTB/TRP (-)	20 µm	J
RTB/TRP (+)	К 20 µm	

**Figura III-7**: Microscopía de fluorescencia de células tumorales: Las células HeLa fueron fijadas 12 horas post-irradiación en presencia de lysotracker red, bajo las diferentes condiciones.

La fluorescencia roja sólo se observó cuando las células fueron irradiadas en presencia de RTB, con o sin Trp (Figura III-7). Sin embargo, la fluorescencia roja vacuolar desaparece cuando se añade 3-MA en los experimentos de irradiación (Figura III-7 G-H y K-L).

La aparición de la fluorescencia característica de Lysotraker red y el efecto protector ejercido por 3-MA confirman la relevancia de la autofagia como un mecanismo de muerte celular en nuestro sistema.

Los experimentos anteriores confirman, que el efecto de los derivados de la RF produce muerte celular tumoral por mecanismos de necrosis, apoptosis y autofagia.

Pese al anterior, el medio de transporte del RTB hacia las células tiene que hacerse mediante liposomas. Los liposomas han demostrado eficacia como medios de transporte en sistemas *in-vivo* pero pueden ser absorbidos por otros tipos células no tumorales a nivel corporal.

Pensando en diferentes mecanismos de transporte de drogas para terapias, la utilización de nanopartículas con fines terapéuticos puede llevar a una mejora en el sistema de transporte.

#### III.2 Sililación de la riboflavina

La modificación de compuestos de RF para mejorar su estabilidad fotoquímica [24, 80] o mejorar su paso a través de la membrana ha sido descrito [18]. Con el fin de mejorar la estabilidad fotoquímica de la RF y con miras a una posible futura aplicación del compuesto en nanopartículas sililadas, se realizó la síntesis correspondiente para poder obtener un compuesto de RF sililado que no afecte sus propiedades fotofísicas y fotoquímicas y permita reaccionar en pasos posteriores con nanopartículas de silicio para su unión covalente. Para esto se procedió a derivatizar la RF en su cadena ribitil. Se realizó una reacción de alcohólisis del grupo ribitil sobre grupos isocianatos para
incorporar 4 grupos etoxi-silanos y así para una posterior incorporación de este producto en la nanopartícula de sílica.

La reacción se llevó a cabo utilizando DMF anhidra como disolvente y trietilamina en atmosfera de N<sub>2</sub> a 70 °C por 48 horas. Uno de los desafíos más importantes de la síntesis fue la purificación, debido a que el grupo etoxisilano es muy reactivo, por lo tanto, la síntesis se tuvo que realizar en cantidades estequeométricas (4:1) y luego extraer el remante mediante alto vacío en temperaturas no mayores a 70 °C. Así se obtuvo el producto que se muestra en la Figura III-8.



**Figura III-8**: Reacción RF + tri-etoxi(3-propilisocianato)silano: Esta reacción se lleva a cabo en condiciones de ausencia de  $O_2$  por 48 horas a 70°C.

Para confirmar la estructura química final del derivado de RF, se realizaron diferentes experimentos de RMN. A continuación, se muestran los espectros H NMR (Figura III-10), C NMR (Figura III-13), C NMR DEPT (Figura III-14), HH COSY (Figura III-11), HC HMQC (Figura III-15), HC HMBC (Figura III-16), en base a los cuales fue posible asignar las señales como se muestra en la Figura III-9 y la Tabla III-2.



Figura III-9: Descripción numérica de RF-Si4

Las asignaciones correspondientes a la molécula (RF-Si4) son las siguientes (se entregan rangos de valores en donde las bandas son muy anchas y no hay definición de señal):

Tabla	<b>III-2</b> :	Asignación						
aproximada desplazamiento 1H								
y 13C.								
Átomo	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H						
2	155.36							
3		9.75-9.30						
4	159.72							
5	134.93							
7	134.72							
8	132.23	7.84-7.60						

9	137.16			
10	148.64			
11	116.35	7.63		
12	131.65			
14	150.29			
15	19.31	2.33		
16	21.34 2.47			
17	41.57	4.92 (a)		
		5.18 (b)		
18	71.60	5.56		
19	71.93	5.44		
20	73.22	4.97		
21	60.43	4.23 (a)		
		4.00 (b)		
22	158.42			
23		5.72		
		5.53		
		5.24		
		4.96		
		4.79		
24	43.69-	3.08-2.70		
	42.84			
25	23.54-	1.55-1.32		
	23.04			
26	7.48-7.35	0.56-0.40		
28	58.29	3.80-3.49		



Figura III-10: 1H-RMN: Experimento de <sup>1</sup>H de RMN en equipamiento bruker de 300 MHz en CDCl<sub>3</sub>.



**Figura III-11**: HH-COSY RMN: Gráfico bidimensional de acoplamiento de hidrógenos cercanos. Las interacciones a 1 carbono de distancia son las más fuertes, pero se pueden observar correlaciones a más de un carbono de distancia. Hidrogenos correlacionados se muestran unidos por cuadrados, de los cuales los vertices indican su punto de interacción en el gráfico.



**Figura III-12**: Ampliación HH-COSY RMN: La zona del gráfico bidimensional entre los rangos de 6,0 a 2,8 ppm (A) se puede observar las correlaciones de los diferentes H23 de la molécula con los diferentes H24. La zona de 6,0 a 3,8 ppm (B).se muestra las correlaciones de los hidrógenos de la cadena ribitil.



Figura III-13: 13C-RMN: Espectro unidimensional de carbono desacoplado en CDCI<sub>3</sub>. Se asigna cada número de carbono con la señal respecto a la molécula de la Figura III-9.



**Figura III-14**: 13C-DEPT-RMN: Gráfico unidimensional realizado en CDCI<sub>3</sub> que diferencia los carbonos tipo CH y CH<sub>3</sub> (desplazamiento positivo) y los carbonos tipo CH<sub>2</sub> (desplazamiento negativo). Los carbonos cuaternarios no aparecen. Se identifica cada señal con su correspondiente carbono.



**Figura III-15**: HC-COSY RMN: Experimento bidimensional que acopla hidrogenos y carbonos unidos directamente. Los acoplamientos detectados de la molécula se destacan en el gráfico, pese a que algunos se superponen.



**Figura III-16**: HMBC: Al compuesto Rf-Si4 se le realizó un experimento de acoplamiento de hidrógeno con carbonos a más de un enelace de distancia. Cabe destacar que los acoplamientos a un enlace aún aparecen pero como doblete, los cuales se descartan del análisis.

Se observó un cambio importante en las propiedades del compuesto RF-Si4, ya que es soluble en solventes apolares (DMF y cloroformo). Esta característica es determinante ya que indica que hubo reacción, porque la RF se disuelve principalmente en agua y muy poco en metanol. Para confirmar la obtención del producto, se analizaron los experimentos de RMNs realizados. Como se puede observar en la Figura III-10, el <sup>1</sup>H-RMN se encuentra caracterizado con sus respectivas señales respecto a nuestra molécula RF-Si4 (Figura III-9). Una característica particular del espectro es la poca definición de las señales obtenidas con respecto a un espectro comparativo de RF tetrabutirato, como el que se observa en la Figura III-17 [24].



**Figura III-17**: 1H-RMN de riboflavina tetrabutirato: Espectro unidimensional de hidrogenos obtenido en un equipo BRUKER de 400 MHz [24].

En la Figura III-10 se puede observar con mayor amplitud de señales del espectro RMN. Pese a que la integración de las señales es correspondiente con nuestro compuesto, estas mismas se aproximan en valores que pueden diferir hasta 0,5 unidades del valor exacto esperado. Ambas características antes mencionadas son indicativas de la posible formación de estructuras

supramoleculares debido a interacciones intramoleculares que amplían los anchos de banda [81]. Pese a lo anterior la caracterización del compuesto se pudo lograr bajo las condiciones descritas.

Comparando con los espectros RMN de otros derivados de RF (Figura III-17), podemos destacar lo siguiente:

- H15 y H16: Ambos deberían aparecer como un singulete bien definido, hecho que solo cumple el H15. H16 aparece formando diferentes singuletes, indicativo de diferentes entornos alrededor del mismo.
- Los H28 y H21 no se resuelven, pero al integrarlos todos juntos el valor es la suma de todos los hidrógenos involucrados.
- Los H8 y H11 deberían aparecer resueltos como singuletes, pero en cambio aparecen como multiplete. Especialmente el H11 aparece desdoblado.

Una de las zonas más complejas de obtener una buena resolución fue la de desplazamiento entre 4,7 ppm y 5,9 ppm. Para esto se utilizó otros espectros resueltos de la RF y se identificaron nuevas señales que fueron resueltas gracias a HH-COSY, HC-COSY y HMBC.

En la Figura III-11 se observa el experimento de HH-COSY. Los acoplamientos H-H de la molécula se puede observar como las interacciones H25-H26 se superponen sobre las señales de H29, que imposibilita su resolución en el espectro de 1 dimensión.

En la Figura III-12 se muestra un aumento de las zonas de acoplamiento entre 4,7 ppm y 5,9 ppm para obtener un mayor detalle de la cadena ribitil de la molécula. Figura III-12-a se observa diferentes acoplamientos con el H24, que corresponden a los diferentes hidrógenos del carbamato (H23) interactuando con los H24. Este lo respalda la literatura en base a desplazamientos descritos para otros carbamatos, como se puede ver en la Figura III-18 [82].



**Figura III-18**: Desplazamiento de 1H de N-metil-etil-carbamato: Desplazamientos de hidrogeno referenciales (en ppm) de la molécula en un espectro unidimensional de RMN [82].

Estos diferentes desplazamientos de los NH del carbamato indicarían diferentes ambientes de cada interacción, indicando diferentes carbamatos unidos a diferentes posiciones de los hidroxilos de la cadena ribitil.

En la Figura III-12-b se expandió la zona ribitil de interaaciones entre hidrógenos de la molécula, que junto a la literatura publicada previamente por nuestro grupo, se pudo describir las diferentes interacciones de los hidrógenos [24]. Con esto podemos confirmar que la zona entre los 4,7 ppm y 5,9 ppm es una zona con superposición de señales.

Se realizaron experimentos de RMN <sup>13</sup>C (Figura III-13), que al comparar con datos de literatura [24], se logró asignar gran parte de las señales, además de las nuevas señales de la nueva molécula. Para confirmar los tipos de carbonos asignados, se realizó un experimento DEPT (Figura III-14). Al igual que el espectro de hidrógenos, se observan bandas anchas para iguales carbonos (ejemplo: C24, C25). Una característica determinante es la no aparición de la señal del carbono del isocianato (122 ppm) y la aparición de la señal del carbamato (158 ppm). A modo de referencia podemos comparar las moléculas de la Figura III-19 [82].





Al realizar el análisis del experimento HC-COSY se pueden confirmar las señales de ambos espectros de una dimensión. Además, se observa que el

C11 se desdobla en dos señales, lo que indicaría interacciones espaciales que harían desdoblar el H11.

En la Figura III-16 se muestra el experimento HMBC, que correlaciona las interacciones de los hidrógenos con los carbonos a más de un enlace de distancia.

Se confirma que algunas señales que se desdoblan corresponden a mismos grupos de hidrógenos pero con desplazamientos diferentes, como por ejemplo el H26, H11, H24. Como hecho importante aparecen las señales internas que confirman la presencia en el compuesto de la estructura proveniente de la RF y la que proviene del compuesto de silicio.

Se realizó un experimento de espectroscopía infrarroja para poder confirmar la formación nuevos grupos en la molécula (Figura III-20).





En la Figura III-21 se muestran diferentes moléculas de referencia que permiten comparar la aparición y desaparición de los siguientes grupos [82]:

- A los 3300 una disminución considerable del ancho de banda y en intensidad, lo que indicaría la no presencia de grupos OH y la mantención de una señal aguda, característica de grupos NH de amidas
- Una disminución considerable de la señal a 2300, que indicaría una desaparición del grupo isocianato.



**Figura III-21**: Espectros IR de referencia: Se muestran espectros infrarojos de referencia de octil-isocianato (A), N-metil-etil-carbamato (B) y Riboflavina (C) para comparar la aparición de señales en nuestra molécula.

## III.3 Nanopartículas en terapia fotodinámica

## III.3.1 Nanopartículas super-paramagnéticas

En los experimentos de fototoxicidad la RF tiene que ser derivatizada con cadenas de butirato (RTB) y encapsulada en liposomas para su transporte a nivel intracelular, para una posible aplicación a futuro en terapia [18]. Esto presenta varias ventajas: mejoran el sistema de transporte de medicamentos que son poco solubles en la sangre, incluyendo las ventajas del aumento de absorción de medicamentos por parte de las células. Al mismo tiempo, ciertas

precauciones deben tenerse en consideración cuando se ocupan liposomas en posibles terapias humanas [83]:

- Los liposomas, dependiendo del fosfolípido, pueden producir reacciones de respuesta inmune [84].
- Estos pueden ser absorbidos por diferentes grupos celulares no tumorales si no son modificados correctamente con mezclas de fosfolípidos o anticuerpos [85].
- Relativa baja estabilidad en condiciones fisiológicas *in-vitro* (datos no mostrados).
- Rápida filtración por parte del sistema renal [83].

Para probar un medio de transporte que pudiera mejorar los sistemas antes mencionados para la RF, que aumente las posibilidades de ser incorporada por tejidos celulares, más estable y que mantuviera las propiedades fotoquímicas de la RF, se ideó un sistema de nanopartículas con un centro magnético recubierto por sílica, en donde en este recubrimiento se incorpore la RF (Esquema III-1).



**Esquema III-1**: Esquema de preparación e incorporación de nanopartículas paramagnéticas, cubiertas con silicio y RF

El principio general de desarrollo de este sistema tendría los siguientes beneficios:

- Tener propiedades magnéticas que pudieran ser usadas para concentrar las nanopartículas en una zona determinada al aplicar un campo externo [49]
- Traer incorporado en el sistema la RF

- Que la RF se mantenga con sus propiedades fotofísicas y fotoquímicas Una de las cualidades que deben mantener las nanopartículas es su superparamagnétismo, para así evitar la magnetización permanente de las partículas después de aplicado un campo magnético tal como se discutió en la introducción. Además de mencionar que los componentes químicos que forman las nanopartículas no sean tóxicos para el cuerpo humano [43]. Las nanopartículas compuestas de óxido ferroso-férrico o en base a hierro son las más idóneas para el caso antes planteado y deben ser sintetizadas de tal forma que mantengan sus propiedades super-paramagnéticas (tamaño máximo de 30nm) y no sean lo suficientemente pequeñas para ser filtradas por el riñón, esto pensando en una aplicación futura en terapia del cáncer [40, 41, 43, 45, 46].

Las nanopartículas de magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) han demostrado invaluable uso en estudios clínicos como soluciones de contraste en RMN y han sido aprobadas para uso clínico en terapias térmicas. La forma posible de poder realizar esto en nuestro laboratorio fue bajo el método de co-precipitación de FeCl<sub>2</sub> y FeCl<sub>3</sub> en ambiente de nitrógeno y en medio básico, a altas revoluciones (33.000 rpm) para así evitar la aglomeración de los núcleos formados. Al formar por co-precipitación los núcleos magnéticos, estos luego tienen un crecimiento constante a medida que los más pequeños se van disolviendo debido a su elevada relación superficie:volumen.

Luego que se han formado los núcleos, estos deben ser rápidamente estabilizados para evitar su aglomeración por aproximación de las partículas que poseen un spin magnético. Esto se realizó agregando ácido cítrico o ácido oléico, los cuales daban la posibilidad de hacer hidrosoluble o liposoluble las nanopartículas. Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión de las nanopartículas sintetizadas por este método se muestran en la Figura III-22.



A (estabilización con ácido cítrico) B (estabilización ácido oleico) **Figura III-22**: Nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: Imágenes obtenidas con microscopía de transmisión electrónica después de que las muestras fueron secadas a alto vacío en grillas de cobre. Para el recubrimiento, se agregó, ácido cítrico (A) o ácido oléico (B), 1,1 mmol de compuesto en agua (A) o acetona (B) al medio de reacción con RF.y la reacción se mantuvo a 80°C por un periodo mínimo de 10 minutos bajo agitación a 30.000 rpm en ambiente de nitrógeno.

Se puede apreciar que los tamaños de las nanopartículas son menores a los 10 nm, situación ideal que permite mantener el super-paramagnetismo de las partículas [64]. Para medir de forma global que las partículas se pueden magnetizar se les aplicó un campo magnético de 0,5 T (imán de Neodimio). Luego de aplicado el campo magnético, al agitar el vial, la disolución vuelve a su estado original (Figura III-23).



**Figura III-23**: Ejemplo práctico de magnetización de las nanopartículas: Se le aplica un campo magnético constante de 0,5 T a la disolución de nanopartículas, la cual en un tiempo de aproximadamente 10 segundos, se concentran hacia el iman. Al retirar el imán, la disolución vuelve a ser homogenea (datos no mostrados).

Para medir el super-paramagnetismo de las moléculas se utilizó el sistema de Efecto magnético óptico de Kerr (MOKE), que permite el cambio de ángulo de la luz polarizada al momento de impactar con el material polarizado [86]. Este experimento no mostró resultado positivo debido a que la sensibilidad del equipo no era lo suficiente para poder medir las propiedades de nuestros nanocompuestos y además de requerir que los compuestos sean reflectantes. Los resultados se muestran en la Figura III-24.



**Figura III-24**: Experimento de MOKE sobre @Fe3O4: Se colocó 30  $\mu$ L de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> sobre la superficie de medición del equipo, el cual se llevó a sequedad.

En esta primera aproximación para la medición del super-paramagnetismo no se obtuvieron resultados positivos debido a que el producto no es reflectante y opaco en disolución. El experimento para confirmar el super-paramagnetismo se planificó para ser realizado más adelante con equipamiento avanzado en el Department of Chemistry and Centre for Catalysis de la Universidad de Ottawa.

## III.3.2 Nanopartículas super-paramagnéticas sililadas (RF@Si@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)

Para incorporar la RF a las nanopartículas magnéticas, fue necesario sililarlas para incorporar la RF en la sílica. La sililación de las nanopartículas magnéticas se realizó bajo el procedimiento de vesícula reversa, en la cual se agrega un surfactante para generar una micela en medio apolar [68]. Se agregan las nanoparticulas en agua, amoniaco como catalizador y luego el

agente reactante tetra-etil-orto-silicato (TEOS) que en presencia de base cataliza la reacción dentro del nano-reactor formando así la capa de sílica sobre la nanopartícula de magnetita. Un esquema de la preparación se muestra en Esquema III-2.



Esquema III-2: Esquema general de sililación de nanopartículas [87].

En la Figura III-25 se muestran Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de las nanopartículas magnéticas sililadas. Se incluyen datos de tamaños a diferentes tiempos de reacción del TEOS en la micela.



A: 32,6 ± 6,0 nm

B: 44,3 ± 8,9 nm

**Figura III-25**: Microscopía electrónica de Si@Fe3O4: Microscopía TEM de nanopartículas de Si@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> secadas a alto vacío por 1 hora previa medición. Las nanopartículas en A se hizo reaccionar el TEOS por 16 horas en la vesícula y en B por 24 horas.

En una siguiente etapa se procedió a incorporar RF directamente en el proceso de polimerización de la sílica sobre la nanopartícula magnética, para ver si directamente se podía encapsular sin ninguna modificación previa. La RF se logra incorporar, pero después de varios lavados, la unión no covalente no es lo suficientemente fuerte para mantener unido el compuesto, con la respectiva disminución de la fluorescencia característica de la RF ( $\lambda$ ex = 450 nm;  $\lambda$ max = 520nm) en la sílica. Esto se puede observar en la Figura III-26.



**Figura III-26**: Fluorescencia de Riboflavina incorporada no-covalentemente en nanopartículas de Si@Fe3O4 después de sucesivos lavados: La RF se agrega junto con el TEOS en una etapa inicial. Cada lavado se realiza con 4 mL de metanol previa centrifucación por 10 minutos a 10.000 rpm.

Se procedió a preparar nanopartículas magnéticas sililadas con RF incorporada utilizando el compuesto de RF-Si4 caracterizado en III.2 (RF-Si4@Si@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>). Para tener blancos de referencia, se prepararon nanopartículas de sílica (@Si) y nanopartículas de sílica con RF incorporada (RF-Si4@Si).

Se utilizaron diferentes relaciones estequiométricas, y en la Figura III-27 se puede observar las imágenes correspondientes a las diferentes preparaciones con sus respectivos análisis de tamaño.



**Figura III-27**: Microscopía electrónica de diferentes nanopartículas con o sin núcleo magnético: Las disoluciones de nanopartículas fueron preparados mediante le método de miscela reversa en donde se agregaron las siguientes cantidades de Rf-Si4 por cada 110 µL de TEOS: 0,5 mg (A y B), 1 mg (C y D) y 1,5 mg (E y F).

Se puede observar que a medida que se agrega mayor cantidad de RF sililada, las nanopartículas comienzan a adquirir forma ovalada, indicando la intercalación de cantidades excesivas de RF-Si4 y zonas en las que probablemente falta de la reacción de polimerización de la TEOS. La relación ideal es 1 mg de RF-Si4 por cada 110 uL de TEOS.

Se planificó realizar la caracterización fotofísica y fotoquímica de las nanopártículas magnéticas con RF incorporada (RF@Si@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) haciendo uso del equipamiento avanzado en una estadía en el departamento de química y centro de catálisis de la Universidad de Ottawa.

Se demostró que el compuesto se incorpora permanentemente en la nanopartícula y que se puede realizar incorporación en la parte interior de la sílica o en la superficie como muestra la Figura III-28. Después de múltiples lavados de las nanopartículas, se mantiene constante la absorbancia característica de RF.



**Figura III-28**: Absorbancia de diferentes preparaciones de nanopartículas: A: nanopartícula de RF-Si4@Si. B: nanopartícula de RF-Si4@Si@Fe3O4. C: nanopartícula de RF-Si4(superficie)@Si.

En estos gráficos se le ha restado una línea base similar a la difracción de nanopartículas magnéticas sin fotosensibilizador para poder realizar

comparaciones de absorbancia de RF incorporada. Pese a que con esta corrección se puede observar el espectro de absorbancia característico de RF, la dispersión es persistente debido a las nanopartículas en el medio, el cual se incrementa con el color opaco de las nanopartículas como el tipo mostrado en la Figura III-28B. El tipo de nanopartículas que se muestra en la Figura III-28C no logran incorporar grandes cantidades de RF, siendo descartado para futuros estudios.

Para obtener información sobre la de generación de oxígeno singlete, se igualaron absorbancias de RF en los tipos de nanopartículas de la Figura III-28 A y B, y estas fueron comparadas con la de RF-Si4 en solución. Los resultados se muestran en la Figura III-29.



**Figura III-29**: Fosforescencia de  ${}^{1}O_{2}$  de diferentes nanopartículas: Se prepararon disoluciones a igual absorbancia de en su banda de los 450 nm. Se utilizó un laser de 355 nm de Nd:YAG (Corinum Surelite III) a una potencia de 5 mJ por pulso. La medición se realizó con un detector fotomultiplicador infrarojo (NIR-Hamatsu Co. R5509).

Se puede observar claramente una disminución considerable en la formación de oxígeno singlete en las nanopartículas que contienen núcleo de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. respecto al generado por RF-Si4 en disolución y también por nanopartículas

de sílica con RF incorporada (RF-Si4@Si) sintetizadas como control sin centro magnético. Se estudió la formación del estado triplete de las nanopartículas RF-Si4@Si@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, sin embargo, al aumentar la concentración para poder obtener la absorbancia requerida, se observó que el color oscuro del núcleo magnético (solución café oscura) difractaba el haz de luz, por lo que no fue posible realizar esta determinación (datos no mostrados).

Estos resultados indican que las nanopartículas magnéticas no son las más adecuadas para incorporar RF con fines de terapia fotodinámica, ya que el centro magnético interfiere con la interacción de la luz con RF y consecuentemente con la generación de oxígeno singlete. No se descarta que puedan ser de utilidad para otros fotosensibilizadores o para otras drogas.

En vistas de estos resultados se decidió estudiar la posibilidad de utilizar las nanopartículas de silica con RF incorporada (RF-Si4@Si), que se sintetizaron como parte del estudio del efecto de la sililación de las nanopartículas magnéticas para la incorporación de RF.

Una de las ventajas más importantes de incorporar la RF a la nanopartícula, fue la estabilización de la cadena ribitil que está asociado con fotoestabilidad y disminución del auto-apagamiento que destruye la droga que ha sido reportado en la literatura [18, 24, 60, 80, 88].

Con el fin de confirmar que el producto formado mantenía sus propiedades fotofísicas y fotoquímicas, se realizaron diferentes experimentos que se detallan a continuación.

## III.4 Propiedades fotofísicas y fotoquímicas de RF-Si4@Si

Se estudiaron las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de RF-Si4 en disolución y después de incorporada en las nanopartículas sililadas, RF-Si4@Si.

En la Figura III-30 se observa el espectro de absorbancia y de fluorescencia de la RF y RF-Si4 en disolución de metanol 0,1M. En la Figura III-31 se muestra el tiempo de vida de la fluorescencia para los mismos casos.



**Figura III-30**: Absorbancia y fluorescencia de RF (línea negra) y RF-Si4 (líneas punteada roja) en disolución: Gráfico de absorbancia en el eje Y de la izquierda y la fluorescencia en el eje Y de la derecha.



**Figura III-31**: Vida media de la fluorescencia de los productos descritos en Figura III-30: Comparación de los tiempos de vida de la fluorescencia mostrando similares tendencia de RF ( $\bullet$ ) y de Rf-Si4 ( $\circ$ ).

Como se puede ver en la Figura III-30, los espectros de absorbancia tienen características similares. El coeficiente de extinción molar de RF es de 13.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> comparado con la de RF-Si4 de 8.000 ± 3.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> a 450 nm. La relación entre los picos máximos es de 1,32 para RF y de 1,38 para RF-Si4, siendo un valor muy cercano entre ellos. Esto es una indicación de que se mantiene la estructura del anillo isoaloxazínico, responsable de las características fotofísicas de la molécula indicando que la modificación sililada no cambian las propiedades fotofísicas de la molécula [24].

En la Tabla III-3 se indican las principales medidas fotofísicas de las moléculas RF, RF-Si4 y nanopartículas RF-Si4@Si.

Compuesto	$\Phi_{\rm F}$	$\tau_{F}$	$\Phi_{\text{T-RF}}$	$\tau_{T}$	$\Phi^{102}$	τ <sup>102</sup>	R	k <sub>q</sub> <sup>O<sub>2</sub></sup>	$\mathbf{k}_{\mathbf{q}}^{DPBF}$
		(ns)		(µs)		(µs)	(dco)	$10^{9}M-1s^{-1}$	$10^{9}M-1s^{-1}$
RF	0,30	5 1+	0,37	12+3	0,30	9,8±0,1	1,0		
		0.1		0			(ref)	—	—
		0,1		0			(4,6)		
RF-Si4	0,35	5,0± 0,1	0,36	33±1,	0.36	0.1+0.1	0,19	0.00+0.1	1 10+0 05
				1	3,1±0,1	(0,23)	0,90±0,1	1,10±0,05	
RF-Si4@Si		0,35	0.35	63 <b>±</b> 2,	0,26	13±0,1	0,12	0,10±0,02	1,70±0,04
			0,00	6			(0,21)		
									0,50±0,02

**Tabla III-3**: Parámetros fotofísicos y fotoquímicos de las moléculas en estudio:  $\Phi_F$ : rendimiento cuántico de fluorescencia.  $\tau_F$ : Tiempo de vida media de fluorescencia.  $\Phi_{T-RF}$ : Rendimiento cuántico de triplete, el cual fue calculado respecto al triplete de Rf asumiendo que el anillo isoaloxazínico no presenta variaciones al ser incorporado dentro de la nanopartícula.  $\tau_T$ : Tiempo de vida media del estado triplete.  $\Phi^{1O2}$ : Rendimiento cuántico de oxígeno singlete que fue medido directamente por la fosforescencia a 1270 nm.  $\tau^{1O2}$ : Tiempo de vida media del oxígeno singlete. R(dco): Grado de fotodegradación del compuesto al ser irradiado con luz a 450 nm en presencia de aire y nitrógeno (valores entre paréntesis).  $k_q^{O_2}$ : Constante de apagamiento de triplete en presencia de O<sub>2</sub>.  $k_q^{DPBF}$ : Constante de apagamiento de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> en presencia de 1,3-difenil-isobenzofurano (DPBF).

Analizando los datos de la Tabla III-3, el rendimiento cuántico de fluorescencia de RF es levemente más bajo que RF-Si4, que es indicativo de la hidrofobicidad del nuevo compuesto alrededor de la molécula. La vida media de fluorescencia de ambos compuestos es similar. Es importante destacar que no se pudieron medir los datos cuantitativos de fluorescencia para las nanopartículas de RF-Si4@Si ya que debido a la dispersión de la luz no fue posible medirlo con exactitud.

El espectro de absorbancia y fluorescencia de la nanopartícula RF-Si4@Si se muestra en la Figura III-32. Se puede observar que pese a la dispersión de la luz en la zona <500 nm se ven los picos característicos de la RF. La línea punteada negra es el espectro de absorbancia de nanopartículas de Si sin RF.



**Figura III-32**: Absorbancia y fluorescencia de Rf-Si4@Si: En el eje Y de la izquierda se observa la absorbancia de las nanopartículas de Rf-Si4@Si (linea azul) y nanopartículas de Si (linea negra). La emisión fluorescente de las nanopartículas de Rf-Si4@Si se observa en el eje Y a la derecha (linea verde).

Al comparar el rendimiento cuántico de formación de tripletes, podemos observar que el valor entre RF, RF-Si4 y RF-Si4@Si es similar entre todos, lo que demuestra que el anillo isoaloxazínico de la molécula, que es la responsable de las propiedades fotofísicas de la molécula, no ha sido modificado y por lo tanto mantiene sus propiedades pese a que está encapsulado dentro de la nanopartícula de silicio. Esto va en directa relación de la disminución del  $k_q^{O_2}$  en la RF-Si4@Si debido a la dificultad de ingreso del O<sub>2</sub> para lograr una desactivación efectiva del triplete que se está generando dentro de la nanopartícula.

Aun así, la vida media del triplete en el caso de RF-Si4@Si aumenta considerablemente en relación a RF en disolución. Este aumento está altamente relacionado al aumento de la rigidez de la molécula dentro de la nanopartícula [59, 89].

Si comparamos el rendimiento cuántico de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> de los 3 compuestos, estos variaron viéndose una disminución a la baja de RF-Si4@Si en comparación con RF. Pese a lo anterior, la vida media de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> se vio aumentada en la nanopartícula. Analizando el tiempo de vida de decaimiento en la Figura III-33 se observa que es monoexponencial, indicando solo un tipo de ambiente en el cual este difunde.



**Figura III-33**: Tiempo de vida del <sup>1</sup>O<sub>2</sub> generado por RF-Si4@Si: La linea negra representa la vida media del oxígeno singlete con un intervalo de confianza del 95%. Las mediciones se realizaron excitando con un laser a 355 nm de Nd:YAG.

Para entender el proceso de difusión del <sup>1</sup>O<sub>2</sub> fuera de la nanopartícula de RF-Si4@Si se realizaron experimentos con el eficiente apagador de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 1,3difenil-iso-benzofurano (DPBF). Los resultados se pueden observar en la Figura III-34.



**Figura III-34**: Gráfico que muestra las diferentes condiciones de  $k_q^{DPBF}$  al apagar el <sup>1</sup>O<sub>2</sub> generado por RF-Si4@Si: Evaluación de la K<sub>OBS</sub> del oxígeno singlete en diferentes condiciones: Rf-Si4 en disolución ( $\blacktriangle$ ) y nanopartículas de Rf-Si4@Si (•••) a diferentes concentraciones del apagador de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> DPBF.

De la Figura III-34 podemos ver que el compuesto RF-Si4 tiene una constante de apagamiento ( $k_q^{DPBF}$ ) de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> de 1,1x10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, que es un valor estándar con respecto a la difusión libre de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> en disolución. Pero al comparar los valores  $k_q^{DPBF}$  de la RF-Si4@Si, podemos observar 3 zonas con diferentes grados de apagamiento. En una primera zona (<25 µM de DPBF) la  $k_q^{DPBF}$  es similar a la difusión de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> en disolución con un valor de 1,7x10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, pero al pasar a valores >25 µM de DPBF, el grado de apagamiento disminuye a 0,5 x10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, dando una indicación que el apagamiento se ve disminuido por el menor alcance de la droga de DPBF al <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, claro indicio de que podría ser generado internamente dentro de nanoestructura y al momento de difundir fuera de esta, puede ser apagado por el DPBF.

Al aumentar la concentración de DPBF a >75  $\mu$ M, el apagamiento disminuye drásticamente (La pendiente de la curva baja con tendencia a 0) demostrando que el oxígeno singlete formado solamente se apaga a medida que el proceso de difusión fuera de la nanopartícula se logra.

Extrayendo los datos de vida media del <sup>1</sup>O<sub>2</sub> en estas condiciones la vida media es de 7,0 µs y aplicando la ecuación de Einstein para difusión, podemos obtener que la molécula alcanza a difundir aproximadamente 10<sup>-7</sup> cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>, similar a las condiciones que se obtienen para la difusión de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> en sistemas compartimentalizados [90].

Al comparar el grado de descomposición de la molécula (R<sub>dco</sub> de laTabla III-3), podemos observar que si tomamos como referencia a la RF en disolución en presencia de O<sub>2</sub> e irradiación continua de luz azul y lo comparamos con las moléculas RF-Si4 y RF-Si4@Si, la disminución de la descomposición de la molécula es de aproximadamente el 90% comparado con RF. Además, como la RF se descompone más rápido en ambiente anaeróbico (datos entre paréntesis de R<sub>decom</sub> de la Tabla III-3) se demuestra que la RF-Si4@Si es aproximadamente 20 veces más estable que RF en disolución [18, 24, 80]. Un ejemplo de esto se puede observar en la Figura III-35.



**Figura III-35**: Foto-descomposición de los compuestos flavínicos en disolución irradiada con luz azul: Se irradió RF (A) y RF-Si4@Si (B) en disolución etanólica con luz azul LED de 450 nm en una cubeta de 1 cm de paso en ambiente de aire.Tiempo de medición de minutos. Las flechas indican el desplazamiento de las bandas a medida que el compuesto

se foto-degrada. En el gráfico C se compara los % relativos de absorbancia medidos a 450 nm con respecto al tiempo.

Con el fin de investigar más allá de un eficiente sistema generador de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> en un sistema nano encapsulado, se realizaron experimentos para ver los efectos en target bajo condiciones controladas.

Se realizó experimento de consumo de oxígeno para demostrar la influencia de diferentes mecanismos de acción fotoquímica (mecanismos tipo I o II) de los diferentes fotosensibilizadores en evaluación en presencia de la proteína HSA. Los resultados se observan en la Figura III-36.



**Figura III-36**: Consumo de oxígeno en presencia de compuestos con efectos fotoquímicos: las mediciones se realizaron en presencia de 50 µM de la proteína HSA como molécula blanco. Además se muestra como afecta en el consumo de oxigeno la presencia de 1,0 mM de azida de sodio (NaN<sub>3</sub>).

Como se puede observar en la Figura III-36, el compuesto RF-Si4, RF y RF-Si4@Si consumen oxígeno a medida que son irradiados con luz azul en presencia de la proteína HSA como blanco fotoquímico. El hecho de consumir oxígeno también puede ser debido a reacciones radicalarias de tipo I.

Para confirmar que el mecanismo principal era por mecanismo tipo II (producción de  ${}^{1}O_{2}$ ) a la solución se le agregó azida de sodio (NaN<sub>3</sub>) conocido por ser un buen apagador de oxígeno singlete. Como se observa en la Figura III-36, la disminución de consumo de oxígeno en ambos casos es significativa.

Pero en el caso de RF-Si4@Si es aún más que en RF, esto puede ser explicado ya que RF es sabida su acción fotoquímica mediante mecanismo mixto tipo I y tipo II.

Pese a que se ha demostrado hasta el momento que RF-Si4@Si es un eficiente generador de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, en este experimento al agregar NaN<sub>3</sub>, se observa un consumo bajo de O<sub>2</sub> en el medio, que puede deberse a residuos de RF expuestos hacia la superficie de la nanopartícula que podrían mantenerse actuando mediante mecanismo tipo I.

En la Figura III-37, se observa la comparación de formación de peróxidos entre RF y RF-Si4@Si. La formación de peróxidos puede ser mediada por <sup>1</sup>O<sub>2</sub> en la proteína HSA, la cual son suficientemente estables para ser medidos en un corto plazo, pero en tiempos más largos se desestabilizan en subproductos. La línea base punteada azul indica la cantidad de peróxidos medidos a tiempo 0 solamente en presencia de HSA y la línea punteada negra corresponde a la misma condición, pero después de irradiada por 60 minutos.



**Figura III-37**: Formación de Peróxidos por RF-Si4@Si: Se utilizó 50  $\mu$ M de HSA como molecula target mientras se irradiaban los diferentes compuestos con luz UVA. Se incluyó mediciones en las cuales se agregó agua deuterada o solo ambiente de N<sub>2</sub>. Se midió el efecto formador de peróxidos con la proteina HSA sola al inicio (linea punteada azul) y al termino de la irradiación (60 min – linea punteada negra) los cuales son los valores bases.

Como se observa en la Figura III-37, la irradiación en presencia de RF genera grandes cantidades de peróxidos en los primeros 20 minutos, pero después
de transcurrido el tiempo esta cantidad disminuye debido al autoapagamiento (aclaramiento) del mismo RF y por consecuencia su efecto fotosensibilizador, para llegar a valores similares que en medio de nitrógeno a los 40 y 60 minutos. En comparación, la nanopartícula de RF-Si4@Si mantiene una producción constante de peróxidos en el medio, con un incremento permanente a medida que transcurre el tiempo.

El efecto del solvente deuterado no aumenta considerablemente la formación de peróxidos, demostrando que el oxígeno singlete generado en la nanopartícula reacciona rápidamente con la proteína del medio [3].

La formación de carbonilos fue medida bajo las mismas condiciones del experimento de la Figura III-37. Los resultados se observan en la Figura III-38.



**Figura III-38**: Formación de Carbonilos en HSA mediante nanopartícula de RF-Si4@Si: La formación de carbonilos se produce en la molécula blanco de HSA a 50 µM bajo irradiación UVA. Se incluye la linea bases de generación de carbonilos solamente por el HSA (linea punteada negra).

El aumento de la formación de carbonilos en presencia de RF, está correlacionado con el mecanismo tipo I efectuado por la misma molécula que puede generar especies radicalarias aún en presencia de trazas de moléculas de O<sub>2</sub>. La nanopartícula de RF-Si4@Si, bajo estas condiciones de experimentación, genera bajos niveles de carbonilos, similares a la línea base

punteada negra en la Figura III-38, que es la cantidad de carbonilos formados por HSA (sin fotosensibilizadores) después de 60 minutos de irradiación. Para demostrar que la nanopartícula de RF-Si4@Si tiene un efecto oxidativo sobre su blanco mediado por <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, se realizaron experimentos de medición de radical superóxido, que es una especie radicalaria generada por mecanismo tipo I en fotosensibilizadores. Se ocupó el compuesto dihidroethidium (DHE) que es un atrapador de radical superóxido y fluórese al reaccionar [76]. Los resultados se pueden observar en la Figura III-39.



**Figura III-39**: Fluorescencia de DHE después de reaccionar con radical superóxido: La formación de radical superóxido se realizo en presencia de HSA como molécula blanco. Se irradió por 360 s con luz azul en presencia de 20 µM de DHE y se observa la fluorescencia generada entre 540-690 nm.

Este último experimento, confirmar la presencia de 0<sup>--</sup><sub>2</sub> cuando la irradiación ocurre en presencia del fotosensibilizador de RF y utilizando como target la proteína HSA, además confirmando que la RF utiliza el mecanismo tipo I como parte de su proceso fotoquímico. La nanopartícula de RF-Si4@Si produce niveles tan bajos como los generados por la HSA como blanco en condiciones sin fotosensibilizador.

## III.5 Citotóxicidad de Nanopartículas Sililadas in-vitro

Con el fin de buscar una futura aplicación biológica de los productos obtenidos, se realizaron experimentos in-vitro en sistemas biológicos.

Como modelo se utilizó células HL-60 de leucemia humana, que permiten un inicio simple y adecuado para los estudios de posibles aplicaciones futuras en terapia de los compuestos en estudio [1, 18, 91].

Para poder comparar efectos finales, se necesita generar el mismo efecto fotoquímico para los fotosensibilizadores en el medio celular, para lo que se requiere que la absorbancia de la luz sea equivalente para todos ellos. En la Figura III-40 se puede observar la absorbancia generada por las nanopartículas de RF-Si4@Si y nanopartículas de Si como medio de control.



**Figura III-40**: Absorbancia de nanopartículas de Silicio y RF-Si4@Si ajustadas respecto a su línea base: Se estandarizó la linea base generada por la difracción de las nanopártículas de Si, que sirvió como linea base para las nanopartículas de RF-Si4@Si. Esta estandarización se realizó en PBS.

Para poder ajustar ambas absorbancias, se mide el valor a 750 nm y se iguala mediante dilución, la cual es:

Tabla III-4: Comparación de absorbancias de		
difracción a 750 nm		
Longitud de onda	Si np	RF-Si4@Si
750	0,183	0,182

En la Figura III-40 se observa una flecha indicativa de que la absorbancia que realmente interesa es la diferencia entre la absorbancia de las nanopartículas de Si y las de RF-Si4@Si. Para poder agregar cantidades similares de fotosensibilizador (RF y RF-Si4@Si) se resta la absorbancia de la absorbancia base de las nanopartículas de Si y de RF-Si4@Si y se compara con una concentración conocida de RF. Esta se puede observar en la Figura III-41.





Con estas condiciones se procedió a hacer un estudio de toxicidad que entregue los primeros indicios de un posible efecto in-vitro de los compuestos. Se estudió la viabilidad celular 24 horas post-efecto de irradiación con luz azul durante 5 minutos después de incorporado el compuesto de RF a concentración de 40 µM por 5 horas y una disolución de nanopartículas de RF-

Si4@Si que tiene la misma absorbancia en la banda a 450 nm después de corregida, con igual tiempo de incorporación previa irradiación.



**Figura III-42**: Viabilidad celular de HL-60 en presencia de RF y RF-Si4@Si: Se sembraron 15.000 células por pocillo en placa de 96. Se procedió a incubar una concentración de 40  $\mu$ M en todas las condiciones y con sus respectivos controles. Se irradió por 5 minutos con luz azul de 450 nm (Luzchem LED-L16).

Como se puede observar en la Figura III-42, el efecto de RF sobre la viabilidad celular es de alrededor de un 80% de perdida de viabilidad. Es importante destacar que cuando se aplica una dosis de 136 mW/cm<sup>2</sup>, la viabilidad celular es de 26% y cuando se aumenta la dosis al máximo medido (952 mW/cm<sup>2</sup>) la viabilidad celular solo disminuye a 19%, respaldando los experimentos fotoquímicos realizados en III.4 que indican una fuerte descomposición de la molécula después de ser irradiada con luz azul [18, 60].

En comparación con la perdida de viabilidad de la nanopartícula de RF-Si4@Si que solo tiene una pérdida de alrededor del 34%, cuando comparamos la viabilidad de 76% obtenida cuando se irradiaron a 136 mW/cm<sup>2</sup> y la que se obtiene cuando se irradiaron a 952 mW/cm<sup>2</sup> (56%). Se puede observar una tendencia a ir disminuyendo la viabilidad a medida que se irradiaron con más luz, indicando un posible efecto protector por parte de la nanoestructura de silicio a la molécula de RF.

De la Figura III-42 podemos observar una rápida disminución de la viabilidad celular con la irradiación de 136 mW/cm<sup>2</sup>, para luego tener disminuciones discretas a medida que se aumenta la irradiación. Esto, además, está correlacionado con el rápido consumo de oxigeno que se puede deber en los inicios de la irradiación y que también se describen en el uso clínico de PDT [8, 54, 92]. Pese a lo anterior, en comparación con la RF y su rápido estancamiento en la reducción de la viabilidad celular (auto-destrucción y falta de O<sub>2</sub>), el nanocompuesto continua reduciendo la viabilidad celular, debido principalmente a su estabilidad y presencia en la superficie de moléculas de RF que permiten actuar parcialmente mediante el mecanismo tipo I.

Pese a lo anterior, estudios preliminares (datos no mostrados) indicarían una baja incorporación de la nanopartícula dentro de la célula, posiblemente debido a varios factores. El primero puede ser la superficie hidrofílica de la nanopartícula que no le permitiría entrar por simple proceso de absorción y endocitosis de membrana [59]. Lo segundo y muy importante, se observó durante los experimentos, que las nanopartículas de silicio, en su superficie presentan grupos hidroxilo que pueden reaccionar con otras nanoesferas cercanas, formando aglomerados más grandes que las simples nanopartículas esféricas observadas por microscopio. Estos procesos pueden ser favorecidos directamente en el proceso de lavado de las nanopartículas (centrifugación a alta velocidad) [57]. Un ejemplo puede observarse en la Figura III-43.



**Figura III-43**: SEM nanopartícula de RF-Si4@Si: Imagen de microscopía electrónica en un microcospio de barrido de nanopartículas de RF-Si4@Si.

Al determinar el diametro promedio por microscopía electrónica se determinó que es 31 nm cada nanopartícula, pero al medir su tamaño mediante Dynamic Light Scattering (DLS), que incluye su diámetro hidrodinámico en disolución, este es de 112 nm. Actualmente en nuestro laboratorio se está investigando modificaciones de la superficie de las nanopartículas para evitar la reacción no deseada entre nanoesferas. Se está buscando agregar cargas positivas a la superficie, para tener repulsión electrostática, lo que en experimentos preliminares ya ha permitido una disminución en el tamaño determinado por DLS [56]. Por otra parte, se está avanzando en aumentar la incorporación de las nanoesferas en desarrollos biológicos que se encuentran en investigación en nuestro laboratorio respecto a cultivo bacteriano y de hongos.

A partir de los desarrollos obtenidos en esta tesis, se abren los siguientes desafíos que necesitan seguir siendo investigados en un futuro:

1.- Síntesis del compuesto: El compuesto fue totalmente caracterizado mediante los experimentos y condiciones de reacción realizadas en esta tesis. Se propone considerar posibles cambios de longitud de cadena de trietoxisilano a tri-metoxisilano como reactantes para sililar a la RF [93], como se puede ver en la Figura III-44.



**Figura III-44**: Mólecula de 3-(trietilsilil)-propil isocianato (izquierda) y metil 3-[(trimetoxisilil)propil] carbamato (Derecha): El compuesto de isocianato fue el utilizado para sililar a la RF. Se postula que el acortamiento del etóxido a metoxisilano puede mejorar las propiedas de la RF. Esta reacción del carbamato de la derecha podría ocurrir con los alcoholes de la cadena ribitil tal como se describe en la literatura [93].

Esto conllevaría en la disminución del tamaño molecular y como consecuencia la disminución de interacciones intramoleculares que simplificarían la resolución completa y detallada de la molécula por experimentos RMN. Pero se debe tener presente que la reactividad de la molécula, debido a los grupos metoxi-silanos, aumentará considerablemente [94]. Siendo muy probable tener que cambiar totalmente la forma de preparación de síntesis del producto a cámara de nitrógeno para evitar trazas de agua ambiental.

2.- Núcleos magnéticos: Debido al color característicos de las nanopartículas de magnetita (café oscuro) estas no se pudieron aplicar en esta tesis por la elevada difracción de la luz. Pese a lo anterior, hay variados autores que han publicado resultados al respecto [8, 49, 95]. Las proyecciones futuras podrían estar orientadas a:

 Utilizar fotosensibilizadores que absorban en la venta terapéutica (sobre los 650 nm y bajo los 1000 nm).

- Núcleo magnético. Esta opción puede ser altamente viable, debido a que existen desarrollados variadas nanopartículas cristalinas que mantienen sus propiedades super-paramagnéticas [40, 96-101], pero siempre y cuando se analice muy bien la posible toxicidad que estos pueden producir en el cuerpo humano (si fuera esta la aplicación deseada).

**3.-** Recubrimiento de la superficie de las nanopartículas: a partir de los logros desarrollados en esta tesis, el siguiente paso es analizar como aumentar la

selectividad de las nanopartículas sililadas en las células blanco. Para mejorar esto, futuros estudios se necesitan en los siguientes aspectos:

 Evitar la aglomeración de las nanopartículas mediante enlaces covalentes que se producen cuando las superficies de SiO<sub>2</sub> se encuentran cercanas.
Variadas soluciones se han propuesto, como por ejemplo el recubrimiento con moléculas de carga iónica negativa o positiva para generar repulsión estática entre los nanocompuestos [57].

- Otra posible solución es el recubrimiento con polímeros biodegradables o unión covalente de moléculas que generen selectividad por las células tumorales [56, 57, 63, 102].

En ambos casos anteriores, se debe evaluar como este nuevo recubrimiento podría afectar la salida del oxígeno singlete que genera daño en las macromoléculas de las células que se busca eliminar.

## Capítulo IV. Conclusiones

- La irradiación con luz visible en presencia de riboflavina y de su derivado RTB induce muerte celular por apoptosis y por autofagia en células humanas de leucemia y de cáncer cérvico uterino.
- Se sintetizaron nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, nanopartículas de Silicio y nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> recubiertas con silicio que mantienen propiedades superparamagnéticas evaluadas macroscópicamente.
- La síntesis y caracterización de un derivado tetrasililado de riboflavina, demostró que mantiene las propiedades fotofísicas y fotoquímicas del fotosensibiliador.
- 4. El compuesto Rf-Si4 permite unirse covalentemente a las capas de silicio de las nanopartículas.
- La síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas a las que se incorporó riboflavina utilizando el derivado sililado (RF-Si4@Si@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), no permitiría su aplicación en terapia debido a interferencias del centro magnético con la luz.
- 6. La síntesis y caracterización de nanopartículas sililadas a las que se incorporó riboflavina utilizando el derivado sililado (RF-Si4@Si) demostró que, en esta preparación, mantienen las propiedades fotoquímicas y fotofísicas del fotosensibilizador, condición necesaria para una posible futura aplicación en terapia fotodinámica.
- La aplicación de RF-Si4@Si en células tumorales en presencia de luz azul, produce una disminución de la viabilidad significativamente en función de su control en oscuridad.
- Pese a lo anterior, su efecto es menor que RF ante las mismas condiciones, lo que indica que el sistema debe ser mejorado para posibles aplicaciones a futuro.

## Bibliografía

- 1. Edwards, A.M., Barredo, F., Silva, E., De Ioannes, A.E., and Becker, M.I., *Apoptosis induction in nonirradiated human hl-60 and murine nso/2 tumor cells by photoproducts of indole-3-acetic acid and riboflavin.* Photochem Photobiol, 1999. **70**(4): p. 645-9.
- 2. Edwards, A.M., Silva, E., Jofre, B., Becker, M.I., and De Ioannes, A.E., Visible light effects on tumoral cells in a culture medium enriched with tryptophan and riboflavin. J Photochem Photobiol B, 1994. **24**(3): p. 179-86.
- 3. Alarcon, E., Edwards, A.M., Aspee, A., Borsarelli, C.D., and Lissi, E.A., *Photophysics and photochemistry of rose bengal bound to human serum albumin.* Photochem Photobiol Sci, 2009. **8**(7): p. 933-43.
- 4. Brasseur, N., *Sensitizers for pdt: Phthalocyanines*, in *Photodynamic therapy*, T. Patrice, Editor. 2003, The Royal Society of Chemistry: Cambridge, U.K.
- 5. Henderson, B.W. and Dougherty, T.J., *Photodynamic therapy. Basic principles and clinical applications*, ed. I. Marcel Dekker. 1992, New York, U.S.A.: Marcel Dekker, Inc.
- 6. Dougherty, T.J., Gomer, C.J., Henderson, B.W., Jori, G., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., and Peng, Q., *Photodynamic therapy.* J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(12): p. 889-905.
- 7. Dougherty, T.J., Gomer, C.J., Henderson, B.W., Jori, G., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., and Peng, Q., *Review. Photodynamic therapy.* J. Natl. Cancer Inst., 1998. **90**(12): p. 889-905.
- 8. Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J., Berr, F., and Kiesslich, T., *Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects.* Lasers Med Sci, 2009. **24**(2): p. 259-68.
- 9. Bechet, D., Couleaud, P., Frochot, C., Viriot, M.L., Guillemin, F., and Barberi-Heyob, M., *Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents.* Trends Biotechnol, 2008. **26**(11): p. 612-21.

- 10. Chatterjee, D.K., Fong, L.S., and Zhang, Y., *Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm.* Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(15): p. 1627-37.
- 11. Josefsen, L.B. and Boyle, R.W., *Review. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers.* Med. Based Drugs., 2008. **2008**: p. ID 276109.
- Bechet, D., Couleaud, P., Frochot, C., Viriot, M.-L., Guillemin, F., and Barberi-Heyob, M., *Review. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents.* Trends Biotechnol., 2008. 26(11): p. 612-621.
- 13. Magaraggia, M., Marigo, L., Pagnan, A., Jori, G., and Visona, A., *Porphyrin-photosensitized processes: Their applications in the prevention of arterial restenosis.* Cardiovasc Hematol Agents Med Chem, 2007. **5**(4): p. 278-88.
- 14. Mojzisova, H., Bonneau, S., and Brault, D., *Review. Structural and physico-chemical determinants of the interactions of macrocyclic photosensitizers with cells.* Eur. Biophys. J., 2007. **36**: p. 943-953.
- 15. Jori, G., *Photodynamic therapy of microbial infections: State of the art and perspectives.* J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2006. **25**(1-2): p. 505-19.
- 16. Jori, G., Fabris, C., Soncin, M., Ferro, S., Coppellotti, O., Dei, D., Fantetti, L., Chiti, G., and Roncucci, G., *Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications.* Lasers Surg Med, 2006. **38**(5): p. 468-81.
- 17. Jori, G., *Tumour photosensitizers: Approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy.* J Photochem Photobiol B, 1996. **36**(2): p. 87-93.
- Munoz, M.A., Pacheco, A., Becker, M.I., Silva, E., Ebensperger, R., Garcia, A.M., De Ioannes, A.E., and Edwards, A.M., *Different cell death mechanisms are induced by a hydrophobic flavin in human tumor cells after visible light irradiation.* J Photochem Photobiol B, 2011. **103**(1): p. 57-67.
- 19. Molinari, A., Colone, M., Calcabrini, A., Stringaro, A., Toccacieli, L., Arancia, G., Mannino, S., Mangiola, A., Maira, G., Bombelli, C., and

Mancini, G., *Cationic liposomes, loaded with m-thpc, in photodynamic therapy for malignant glioma.* Toxicol In Vitro, 2007. **21**: p. 230-234.

- 20. Nunes, S.M.T., Sguilla, F.S., and Tedesco, A.C., *Photophysical studies* of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. Braz. J. Med. Biol. Res., 2004. **37**: p. 273-284.
- 21. Rodríguez, M.E., Awruch, J., and Dicelio, L.E., *Photophysical properties of zn(ii) phthalocyaninates incorporated into liposomes.* J. Phorphyr. Phthalocyanines., 2002. **6**(2): p. 122-129.
- 22. Silva, E., Ugarte, R., Andrade, A., and Edwards, A.M., *Riboflavin-sensitized photoprocesses of tryptophan.* J Photochem Photobiol B, 1994. **23**(1): p. 43-8.
- 23. Silva, E., Furst, S., Edwards, A.M., Becker, M.I., and De Ioannes, A.E., Visible light anaerobic photoconversion of tyrosine sensitized by riboflavin. Cytotoxicity on mouse tumoral cells. Photochem Photobiol, 1995. **62**(6): p. 1041-5.
- 24. Edwards, A.M., Bueno, C., Saldano, A., Silva, E., Kassab, K., Polo, L., and Jori, G., *Photochemical and pharmacokinetic properties of selected flavins.* J Photochem Photobiol B, 1999. **48**(1): p. 36-41.
- 25. MacDonald, I.J. and Dougherty, T.J., *Review. Basic principles of photodynamic therapy.* J. Porphyrins and Phthalocyanines, 2001. **5**: p. 105-129.
- Dunkern, T.R., Fritz, G., and Kaina, B., Ultraviolet light-induced DNA damage triggers apoptosis in nucleotide excision repair-deficient cells via bcl-2 decline and caspase-3/-8 activation. Oncogene, 2001. 20(42): p. 6026-38.
- 27. Pablo Aránguiz, A.C., Diego Rojas, Rodrigo Troncoso, PaolaMarambio, Bárbara Toro, Carlos Sanhueza, Christian Penannen, Jessica Diaz-Elizondo, Valentina Parra, Mario Chiong, Guillermo Díaz-Araya, SergioLavandero., Autofagia del cardiomiocito: ¿un nuevo mecanismo de adaptación al estrés o de muerte celular? Revista Chilena de Cardiología, 2006. 25(3): p. 331-338.
- 28. Lockshin, R.A. and Zakeri, Z., *Review. Apoptosis, autophagy, and more.* Int. J. Biochem. Cell Biol., 2004. **36**: p. 2405–2419.

- 29. Edwards, A.M. and Silva, E., *Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids.* J Photochem Photobiol B, 2001. **63**(1-3): p. 126-31.
- Kessel, D. and Segarra Arroyo, A., Apoptotic and autophagic responses to bcl-2 inhibition and photodamage. Photochem. Photobiol. Sci., 2007(6): p. 1290–1295.
- 31. Buytaert, E., Callewaert, G., Vandenheede, J.R., and Agostinis, P., Deficiency in apoptotic effectors bax and bak reveals an autophagic cell death pathway initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum. Autophagy, 2006. **2**(3): p. 238-240.
- 32. Buytaert, E., Dewaele, M., and Agostinis, P., *Review molecular effectors* of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. Biochim. Biophys. Acta, 2007. **1776**: p. 86–107.
- 33. Reiners, J.J., Agostinis, P., Berg, K., Oleinick, N.L., and Kessel, D., *Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy*. Autophagy, 2010. **6**(1): p. 7-18.
- 34. Piette, J., Volanti, C., Vantieghem, A., Matroule, J.-Y., Habraken, Y., and Agostinis, P., *Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers.* Biochem. Pharmacol., 2003. **66**(6): p. 1651-1659.
- 35. Gozuacik, D. and Kimchi, A., *Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism.* Oncogene, 2004. **23**: p. 2891–2906.
- 36. Guillon-Muñoz, A., van Bemmelen, M.X.P., and Clarke, G.P.H., *Role of phosphoinositide 3-kinase in the autophagic death of serum-deprived pc12 cells.* Apoptosis, 2005. **10**: p. 1031-1041.
- 37. Kessel, D., Vicente, M.G.H., and Reiners, J.J., *Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy.* Autophagy, 2006. **2**(4): p. 289-290.
- Kessel, D., Vicente, M.G.H., and Reiners, J.J., *Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy.* Lasers Surg. Med., 2006. 38(5): p. 482-488.
- Munafó, D.B. and Colombo, M.I., A novel assay to study autophagy: Regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. J. Cell Sci., 2001. 114: p. 3619-3629.

- 40. Jun, Y.W., Seo, J.W., and Cheon, J., *Nanoscaling laws of magnetic nanoparticles and their applicabilities in biomedical sciences.* Acc Chem Res, 2008. **41**(2): p. 179-89.
- 41. Sun, C., Lee, J.S., and Zhang, M., *Magnetic nanoparticles in mr imaging and drug delivery.* Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(11): p. 1252-65.
- 42. Dobson, J., *Magnetic nanoparticles for drug delivery.* Drug Development Research, 2006. **67**(1): p. 55-60.
- 43. Veiseh, O., Gunn, J.W., and Zhang, M., *Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging.* Adv Drug Deliv Rev, 2010. **62**(3): p. 284-304.
- 44. Goesmann, H. and Feldmann, C., *Nanoparticulate functional materials.* Angew Chem Int Ed Engl, 2010. **49**(8): p. 1362-95.
- 45. Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., and Muller, R.N., *Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications.* Chem Rev, 2008. **108**(6): p. 2064-110.
- 46. Lu, A.H., Salabas, E.L., and Schuth, F., *Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application.* Angew Chem Int Ed Engl, 2007. **46**(8): p. 1222-44.
- 47. Arruebo, M., Fernández-Pacheco, R., Ibarra, M.R., and Santamaría, J., *Magnetic nanoparticles for drug delivery.* Nano Today, 2007. **2**(3): p. 22-32.
- 48. Qian, J., Gharibi, A., and He, S., *Colloidal mesoporous silica nanoparticles with protoporphyrin ix encapsulated for photodynamic therapy.* J Biomed Opt, 2009. **14**(1): p. 014012.
- 49. Chen, Z.L., Sun, Y., Huang, P., Yang, X.X., and Zhou, X.P., Studies on preparation of photosensitizer loaded magnetic silica nanoparticles and their anti-tumor effects for targeting photodynamic therapy. Nanoscale Res Lett, 2009. **4**(5): p. 400-408.
- 50. Qian, H.S., Guo, H.C., Ho, P.C., Mahendran, R., and Zhang, Y., *Mesoporous-silica-coated up-conversion fluorescent nanoparticles for photodynamic therapy.* Small, 2009. **5**(20): p. 2285-90.

- 51. Camerin, M., Moreno, M., Marin, M.J., Schofield, C.L., Chambrier, I., Cook, M.J., Coppellotti, O., Jori, G., and Russell, D.A., *Delivery of a hydrophobic phthalocyanine photosensitizer using pegylated gold nanoparticle conjugates for the in vivo photodynamic therapy of amelanotic melanoma.* Photochem Photobiol Sci, 2016. **15**(5): p. 618-25.
- 52. Camerin, M., Magaraggia, M., Soncin, M., Jori, G., Moreno, M., Chambrier, I., Cook, M.J., and Russell, D.A., *The in vivo efficacy of phthalocyanine-nanoparticle conjugates for the photodynamic therapy of amelanotic melanoma.* Eur J Cancer, 2010. **46**(10): p. 1910-8.
- 53. Vargas, A., Pegaz, B., Debefve, E., Konan-Kouakou, Y., Lange, N., Ballini, J.-P., van den Bergh, H., Gurny, R., and Delie, F., *Improved photodynamic activity of porphyrin loaded into nanoparticles: An in vivo evaluation using chick embryos.* Int. J. Pharm., 2004. **286**(1-2): p. 131-145.
- 54. Wang, S., Gao, R., Zhou, F., and Selke, M., *Nanomaterials and singlet* oxygen photosensitizers: Potential applications in photodynamic therapy. J. Mater. Chem., 2004. **14**: p. 487-493.
- Hone, D.C., Walker, P.I., Evans-Gowing, R., FitzGerald, S., Beeby, A., Chambrier, I., Cook, M.J., and Russell, D.A., *Generation of cytotoxic* singlet oxygen via phthalocyanine-stabilized gold nanoparticles: A potential delivery vehicle for photodynamic therapy. Langmuir, 2002. 18(8): p. 2985-2987.
- 56. Wu, S.H., Mou, C.Y., and Lin, H.P., *Synthesis of mesoporous silica nanoparticles.* Chem Soc Rev, 2013. **42**(9): p. 3862-75.
- 57. Guerrero-Martinez, A., Perez-Juste, J., and Liz-Marzan, L.M., *Recent progress on silica coating of nanoparticles and related nanomaterials.* Adv Mater, 2010. **22**(11): p. 1182-95.
- 58. Wu, W.-B., Liu, C., Wang, M.-L., Huang, W., Zhou, S.-R., Jiang, W., Sun, Y.-M., Cui, Y.-P., and Xu, C.-X., *Uniform silica nanoparticles encapsulating two-photon absorbing fluorescent dye.* Journal of Solid State Chemistry, 2009. **182**(4): p. 862-868.
- 59. Rossi, L.M., Silva, P.R., Vono, L.L.R., Fernandes, A.U., Tada, D.B., and Baptista, M.c.S., *Protoporphyrin ix nanoparticle carrier: Preparation, optical properties, and singlet oxygen generation.* Langmuir, 2008. **24**(21): p. 12534-12538.

- 60. Angeluzzi, N.C., Muñoz, M., Marquez, D.T., Baptista, M.S., Edwards, A.M., Alarcon, E.I., and Scaiano, J.C., *Silica nanoreactors from silylated riboflavin for efficient singlet oxygen delivery.* Journal of Materials Chemistry B, 2014. **2**(27): p. 4221.
- 61. Magaraggia, M., Jori, G., Soncin, M., Schofield, C.L., and Russell, D.A., Porphyrin-silica microparticle conjugates as an efficient tool for the photosensitised disinfection of water contaminated by bacterial pathogens. Photochem Photobiol Sci, 2013. **12**(12): p. 2170-6.
- 62. Haw, C.Y., Chia, C.H., Zakaria, S., Mohamed, F., Radiman, S., Teh, C.H., Khiew, P.S., Chiu, W.S., and Huang, N.M., *Morphological studies of randomized dispersion magnetite nanoclusters coated with silica.* Ceramics International, 2011. **37**(2): p. 451-464.
- 63. Cong, H., Toftegaard, R., Arnbjerg, J., and Ogilby, P.R., *Silica-coated gold nanorods with a gold overcoat: Controlling optical properties by controlling the dimensions of a gold-silica-gold layered nanoparticle.* Langmuir, 2010. **26**(6): p. 4188-95.
- Lee, J., Lee, Y., Youn, J.K., Na, H.B., Yu, T., Kim, H., Lee, S.M., Koo, Y.M., Kwak, J.H., Park, H.G., Chang, H.N., Hwang, M., Park, J.G., Kim, J., and Hyeon, T., Simple synthesis of functionalized superparamagnetic magnetite/silica core/shell nanoparticles and their application as magnetically separable high-performance biocatalysts. Small, 2008. 4(1): p. 143-52.
- 65. Haddad, P.S., Duarte, E.L., Baptista, M.S., Goya, G.F., Leite, C.A.P., and Itri, R., *Synthesis and characterization of silica-coated magnetic nanoparticles.* 2004: p. 232-238.
- Ding, J., Hudalla, C.J., Cook, J.T., Walsh, D.P., Boissel, C.E., Iraneta, P.C., and O'Gara, J.E., Synthesis and surface chemistry of spherical mesoporous organic-inorganic hybrid particles with an. Integrated alcohol functionality on the pore surface. Chemistry of Materials, 2004. 16(4): p. 670-681.
- 67. Philipse, A.P., van Bruggen, M.P.B., and Pathmamanoharan, C., Magnetic silica dispersions: Preparation and stability of surfacemodified silica particles with a magnetic core. Langmuir, 1994. **10**(1): p. 92-99.

- 68. Stöber, W.F., Arthur; Bohn, Ernst, *Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range.* Journal of Colloid and Interface Science, 1968. **26**(1): p. 62-69.
- 69. Kremer, J.M.H., v. d. Esker, M.W.J., Pathmamanoharan, C., and Wiersema, P.H., *Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection met hod.* Biochemistry, 1977. **16**(17): p. 3932-3935.
- 70. Strober, W., *Trypan blue exclusion test of cell viability.* Curr Protoc Immunol, 2001. **Appendix 3**: p. Appendix 3B.
- 71. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays.* J. Immunol. Methods., 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
- 72. MARAMBIO RETAMAL, H.P., *Evaluación de la citotoxicidad de nanopartículas de oro conjugadas al péptido clpffd-nh2*, in *Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas*. 2007, Universidad de Chile.
- 73. Kozio, J. and Knobloch, E., *The solvent effect on the fluorescence and light absorption of riboflavin and lumiflavin.* Biochim. Biophys. Acta, 1965. **102**(1): p. 289-300.
- 74. Jiang, Z.-Y., Hunt, J.V., and Wolff, S.P., *Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein.* Anal Biochem., 1992. **202**: p. 384-389.
- 75. Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.P., Shacter, E., and Lester, P., [37] carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins, in *Met. Enzymol.* 1994, Academic Press. p. 346-357.
- 76. Fink, B., Laude, K., McCann, L., Doughan, A., Harrison, D.G., and Dikalov, S., Detection of intracellular superoxide formation in endothelial cells and intact tissues using dihydroethidium and an hplc-based assay. Am. J. Physiol. Cell Physiol., 2004. 287(4): p. C895-C902.
- 77. Peshavariya, H.M., Dusting, G.J., and Selemidis, S., *Analysis of dihydroethidium fluorescence for the detection of intracellular and extracellular superoxide produced by nadph oxidase.* Free Rad. Res., 2007. **41**(6): p. 699-712.
- 78. Edwards, A.M., *Chapter 1 general properties of flavins*, in *Flavins: Photochemistry and photobiology*, A.M. Edwards and Silva, E., Editors. 2006, The Royal Society of Chemistry. p. 1-11.

- 79. Edwards, A.M. and Silva, E., *Flavins. Photochemistry and photobiology*. Vol. I. 2006, Cambridge, U.K.: Royal Society of Chemistry.
- Insińska-Rak, M., Sikorska, E., Bourdelande, J.L., Khmelinskii, I.V., Prukała, W., Dobek, K., Karolczak, J., Machado, I.F., Ferreira, L.F.V., Dulewicz, E., Komasa, A., Worrall, D.R., Kubicki, M., and Sikorski, M., *New photochemically stable riboflavin analogue—3-methyl-riboflavin tetraacetate.* Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2007. **186**(1): p. 14-23.
- 81. Jahnke, W. and Widmer, H., *Protein nmr in biomedical research.* Cellular and Molecular Life Sciences, 2004. **61**(5).
- 82. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), J. Spectral database for organic compounds, sdbs. 2017; Available from: <u>http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre\_index.cgi</u>.
- 83. Derycke, A.S.L. and De Witte, A.M., *Liposomes for photodynamic therapy.* Adv. Drug. Deliv. Rev., 2004. **56**(1): p. 17–30.
- 84. Yadav, A.V., Murthy, M.S., Shete, A.S., and Sfurti, S., *Stability aspects of liposomes.* Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 2011. **45**(4): p. 12.
- 85. Ricchelli, F., Jori, G., Gobbo, S., and Tronchin, M., *Liposomes as models to study the distribution of porphyrins in cell membranes.* Biochim Biophys Acta, 1991. **1065**(1): p. 42-8.
- 86. Kalska, B., Fumagalli, P., Hilgendorff, M., and Giersig, M., *Co/coo core-shell nanoparticles—temperature-dependent magneto-optic studies.* Materials Chemistry and Physics, 2008. **112**(3): p. 1129-1132.
- 87. Vono, L.L.R., Studies on the immobilization of photosensitizers in magnetic nanomaterials, in Institute of Chemistry (IQ). 2010, University of São Paulo.
- 88. Edwards, A.M., *Structure and general properties of flavins.* Methods Mol Biol, 2014. **1146**: p. 3-13.
- 89. Turro, N.J., Ramamurthy, V., and Scaiano, J.C., *Modern molecular photochemistry of organic molecules*. University sciences books. 2010, Sausalito, California, U.S.A.: University Sciences Books. 1084.

- 90. Longmuir, I., Koyama, T., Araiso, T., and Mochizuki, M., *Oxygen diffusion coefficient of cell membranes*, in *Oxygen transport to tissue viii*. 1986, Springer US. p. 99-106.
- 91. García, A.M., Alarcón, E., Muñoz, M., Scaiano, J.C., Edwards, A.M., and Lissi, E., *Photophysical behaviour and photodynamic activity of zinc phthalocyanines associated to liposomes.* Photochem. Photobiol. Sci., 2011. **DOI: 10.1039/c0pp00289e**: p. 1-8.
- 92. Skovsen, E., Snyder, J.W., Lambert, J.D.C., and Ogilby, P.R., *Lifetime and diffusion of singlet oxygen in a cell.* J. Phys. Chem. B, 2005. **109**(18): p. 8570-8573.
- 93. Gaylord, N.G. and Sroog, C.E., *The reactions of carbamates with alcohols.* The Journal of Organic Chemistry, 1953. **18**(12): p. 1632-1637.
- 94. Brochier Salon, M.-C. and Belgacem, M.N., *Hydrolysis-condensation kinetics of different silane coupling agents.* Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 2011. **186**(2): p. 240-254.
- 95. Primo, F.L., Michieleto, L., Rodrigues, M.A.M., Macaroff, P.P., Morais, P.C., Lacava, Z.G.M., Bentley, M.V.L.B., and Tedesco, A.C., Magnetic nanoemulsions as drug delivery system for foscan®: Skin permeation and retention in vitro assays for topical application in photodynamic therapy (pdt) of skin cancer. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2007. **311**(1): p. 354-357.
- 96. Maity, D., Choo, S.-G., Yi, J., Ding, J., and Xue, J.M., *Synthesis of magnetite nanoparticles via a solvent-free thermal decomposition route.* Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2009. **321**(9): p. 1256-1259.
- 97. Lim, J., Tilton, R.D., Eggeman, A., and Majetich, S.A., *Design and synthesis of plasmonic magnetic nanoparticles.* Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2007. **311**(1): p. 78-83.
- 98. Lai, J.H., Kuo, C.C., Liu, Y.C., and Huang, J.C.A., *Thermal evolution of magnetic anisotropy of fe nanoparticles.* Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2007. **310**(2): p. e803-e805.
- 99. Furlani, E.J. and Furlani, E.P., *A model for predicting magnetic targeting of multifunctional particles in the microvasculature.* Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2007. **312**(1): p. 187-193.

- 100. Neuberger, T., Schöpf, B., Hofmann, H., Hofmann, M., and von Rechenberg, B., *Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system.* Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2005. **293**(1): p. 483-496.
- 101. D'Orazio, F., Lucari, F., Melchiorri, M., de Julián Fernández, C., Mattei, G., Mazzoldi, P., Sangregorio, C., Gatteschi, D., and Fiorani, D., Blocking temperature distribution in implanted co-ni nanoparticles obtained by magneto-optical measurements. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2003. 262(1): p. 111-115.
- 102. Dadashzadeh, S., Vali, A.M., and Rezaie, M., *The effect of peg coating* on in vitro cytotoxicity and in vivo disposition of topotecan loaded liposomes in rats. Int. J. Pharm., 2008. **353**(251-259).