





excelencia uam csic













MÁSTERES de la UAM

Facultad de Ciencias /11-12

Máster en Nanociencia y Nanotecnología Molecular.

Síntesis y caracterización de derivados de ftalocianinas metálicas MPcs (M=Zn, Ru,Si, Al) para aplicación en terapia fotodinámica Laura Sánchez Contreras Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad Autónoma de Madrid bajo la dirección de los profesores Tomás Torres Cebada y Uwe Hahn, los ensayos biológicos fueron realizados en el Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CINTROP) de la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Colombia) bajo la dirección de los profesores Fernando Martínez y Patricia Escobar.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	3
2. OBJETIVOS	8
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
3.1. Síntesis y caracterización de derivados de ftalocianinas	
metálicas (MPcs)	9
3.2. Determinación del efecto fototóxico de las MPcs	16
3.2.1. Ensayos en macrófagos (Células. THP-1)	16
3.2.2. Ensayos de fototoxicidad en amastigotes intracelulares	18
3.3. Internalización de las MPcs en macrófagos.	19
3.3.1. Cuantificación de los compuestos internalizados	19
4. CONCLUSIONES	21
5. PARTE EXPERIMENTAL	
5.1. Materiales y Métodos	22
5.2. Síntesis de ftalocianinas metálicas precursoras	22
5.3. Síntesis de los derivados de Colesterol Oleato	22
5.4. Síntesis de ftalocianinas metálicas funcionalizadas con la	
molécula de colesterol ester (MPc-CO)	25
5.5. Determinación del efecto fototóxico de las MPcs	26

pág.

INTRODUCCIÓN

La Leishmania es un parásito protozoario patógeno, agente causal de la leishmaniasis, enfermedad que afecta a un gran número de personas del Nuevo y Viejo Mundo. Durante su ciclo biológico el parásito alterna entre un estado extracelular promastigote en el insecto vector y un estado intracelular amastigote que reside dentro del compartimiento fagolisosomal del macrófago en el mamífero anfitrión u hospedero. Los tratamientos tradicionales empleados para combatir la Leishmania no son completamente adecuados y presentan eficacia variable y efectos secundarios indeseables.

La terapia fotodinámica (PDT), es una alternativa empleada recientemente para destruir células cancerígenas y microorganismos; debido a la acción de especies reactivas de oxígeno generadas *in situ* mediante un proceso fotoquímico que involucra la interacción de un compuesto químico, conocido como fotosensibilizador (PS), que se excita en presencia de un haz específico de luz, para activar el oxígeno molecular. En el CINTROPde la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Colombia) se ha encontrado que la incubación con las ftalocianinas de AIPcCI y ZnPc genera una alta fototóxicidad en promastigotes de *Leismania chagasi* y *Leishmania panamensis* al ser irradiados con luz visible (670 nm) sin presentar toxicidad para los parásitos en la oscuridad [1-3].

Dado que la leishmaniasis presenta características similares con ciertos tipos de cáncer, se puede pensar en el empleo de estrategias similares para su tratamiento. En el tratamiento fotodinámico contra el cáncer se han empleado ciertos grupos transportadores para incrementar la efectividad del efecto fototóxico y la selectividad del PS, facilitando el ingreso selectivo de los PS a determinados organelos celulares ya sea mediante el empleo de receptores (por ejemplo: receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL), utilizando compuestos incorporados dentro de la partícula de LDL) o mediante procesos de difusión pasiva. Se han formando sistemas bioconjugados: del PS con lipoproteínas de alta (HDL) y baja densidad (LDL), albúminas, liposomas, partículas poliméricas, anticuerpos, y transferinas. También se han empleado

¹ Hernández, I., Rueda, C., Escobar, P., Pedraza-Avella, J.A., Martinez-Ortega, F., Páez- Mozo, E.A., Sosa, J. L., Alexander-Katz, R., and López, T., XIV International Materials Research Congress, Simposium 14 SolGel Applications, August 21-25, 2005. Cancún, México.

² Escobar, P., Hernández, I., Rueda, C. M., Martínez, F., Páez, E.; Biomédica. 2006; 26(Supl.1):49-56.

³ Valdivieso, W., Hernández, I. P., Pedraza-Avella, J. A., Martínez-Ortega, F., Páez-Mozo, E. A., López, T. and Escobar, P., Solgel, Guanajuato, 2006.

anexinas, bisfosfonatos, esteroides, toxinas y lectinas, entre otras, para aumentar el ingreso selectivo del FS en la célula [4-6].

El objetivo principal de esta investigación fue desarrollar sistemas fototóxicos para destruir *in vitro* parásitos intracelulares de *L. panamensis*; mediante el empleo de PS incorporados en LDL (PS-LDL). Dichos sistemas se basan en el acoplamiento entre la LDL y un PS (ftalocianinas metálicas funcionalizadas con una molécula de colesterol oleato en posición periférica o axial según sea el caso y sin funcionalizar (MPc-CO, MPc, M= Zn, Ru, Al y Si)).

⁴ Saad, M., Garbuzenko, O. B., Ber, E., Chandna, P., Khandare, J. J., Pozharov, V. P., Minko, T., Journal of Controlled Release, 2008, 2:107-114

⁵ Damoiseau, X.; Schuitmaker, H.J.; Lagerberg, J.W.M.; Hoebeke, M., J. Photochem. Photobiol. B Biol. 2001; 60:50-60.

⁶ Khan, E.H., Ali, H., Tian, H., Rousseauf, J., Tessier, G., Shafiullah, J.E. van Lier,, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2003; 13:1287-1290.

1. ANTECEDENTES

La leishmaniasis se puede clasificar en tres grandes tipos de acuerdo a la zona afectada en: leishmaniasis cutánea, leishmaniasis mucosa, y leishmaniasis visceral. En la figura 2., se muestra el ciclo de vida del parásito de Leishmania, la infección se inicia cuando los mosquitos hembra del genero *Plebotomus* regurgitan los promastigotes en un hospedero mamífero al tomar la sangre de éste (etapa 1) y son internalizados por los macrófagos tisulares (etapa 2). Dentro de estas células, los promastigotes pierden su flagelo y se transforman en amastigotes (etapa 3), los cuales se multiplican por fisión binaria en la vacuola parasitófora la cual se fusiona con los lisosomas (etapa 4). Estos pueden romper la célula y liberarse para infectar otras células del mismo tipo [7].



Figura 1. Ciclo de vida del parásito de *Leishmania*. Fuente: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx

1.1. Tratamientos contra Leishmania

Según la organización mundial de la salud las sales antimoniales: gluconato sódico de antimónio (pentostan[®]) y el antimoniato meglumine (glucantime[®]) se consideran como los medicamentos de primera línea en el tratamiento quimioterapéutico de la leismaniasis [8]. Éstos actúan inhibiendo la ruta glucolítica y la β -oxidación de ácidos grasos de las membranas de los amastigotes. No obstante, el uso de estas drogas está ligado a un elevado

⁷ Descoteaux, A., Turco, S., Biochimica et Biophysica Acta. 1999; 1455: 341-352.

⁸ Machado, J., et al. Internacional dermatology dermocosmetic. 2002; 5: 256-262.

efecto cardiotóxico y nefrotóxico [9][,] al ser usadas por vía intramuscular, adicionalmente se ha encontrado que el parásito presenta un aumento de resistencia a estas drogas y poseen un alto costo y poca disponibilidad en el mercado. La termoterapia, la electroterapia y la crioterapia, así como la inhibición de enzimas vitales para la supervivencia del parásito, son métodos alternativos empleados para destruir los parásitos de *Leishmania* [10,11].

Recientemente la PDT ha sido empleada para el tratamiento de leishmaniasis cutánea [12], empleándose como fotosensibilizadores: azul de metileno [13], el acido ɣ-aminolevulinico [14] que es un liberador de protoporfirina IX, fenazinas [15], derivados de ftalocianinas entre las que podemos encontrar derivados de ftalocianinas de zinc, y silicio [2,16-17], y porfirinoides catiónicos [18]; principalmente en estudios *in vitro* con *L. amazonensis* y *L. panamensis*. En la figura 2., se muestran las estructuras de los PS empleados en PDT contra Leishmania.



Figura 2. Estructura de los PS empleados en PDT contra Leishmania.

La PDT se basa en reacciones fotooxidativas (ver figura 3), las cuales inducen múltiples reacciones biológicas y morfológicas consecutivas [19]. En términos generales, el proceso se inicia cuando el PS, que se encuentra acumulado en el tejido, es irradiado con luz visible de una longitud de onda apropiada, esta radiación lo excita desde su estado basal (PS⁰) hasta el estado singülete excitado ¹PS*, el cual puede relajarse por dos vías: (i) por emisión de

⁹ Carcelén, et al. Análisis retrospectivo de la utilización de anfotericina B liposomal. Servicio de farmacia, hospital de Zaragoza. 1996; 20: 125-128.

¹⁰ Yepez, J., Scorza, J. Quimioterapia de la Leishmaniasis cutánea localizada. Boletín de malariología y salud ambiental. 2003; XLIII: 893-896.

¹¹ Moskowitz, P., Kurban, A., Treatment of cutaneuos Leishmaniasis retrospectives and advances for the 21st century. Clinics in dermatology. 1999; 17:305-315.

¹² Enk C. D., et al., Arch. Dermatol. 2003; 139:432–434.

¹³ Peloi L., et al., Experimental Parasitology. 2011; 128(4): 353-356

¹⁴ Akilov O., et al, Experimental Dermatology, 2007; 16(8): 651-660

¹⁵ Akilov O., et al, Photochemical & Photobiological Sciences, 2007; 6(10): 1067-1075.

¹⁶ Dutta S., et al.; PLoS One, 2011; 6(6): e20786.

¹⁷ Lopez T., et al., Nanomedicine, 2010; 6 (6): 777-785.

¹⁸ Gardner D., et al., Photochemistry and Photobiology, 2010; 86(3): 645-652.

¹⁹ Buytaert, E., Dewaele, M., Agostinis, P., Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 2007, 1776, :86-107.

un fotón fluorescente que regresa el PS al estado fundamental (PS⁰) y (ii) pasar al estado excitado triplete (³PS*) por entrecruzamiento entre sistemas [20], que puede reaccionar con el medio por transferencia de carga (tipo I) generando radicales libres, como el radical hidroxilo ('OH) o iones superóxido (O_2^{-}) por transferencia de hidrógeno ó de electrones. También, puede interaccionar mediante transferencia de energía con el oxígeno (tipo II) para generar oxígeno singülete, que es la principal especie citotóxica. El hecho que se favorezca un tipo de reacción u otro depende de las características fisicoquímicas del PS y el medio donde se generen [21]. Estas especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden causar daño irreversible en membranas celulares incluyendo el plasma, la mitocondria, los lisosomas y las membranas nucleares, y pueden modificar las proteínas [22].



Figura 3. Esquema general de fotorreacciones tipo I y II presentes en la TFD Fuente: modificado de Buytaert, et al, 2007 [19]

En el CINTROP de la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Colombia), se ha venido trabajando en los últimos años sobre el uso de derivados de ftalocianinas de aluminio y zinc en estudios *in vitro* contra *L. panamensis* con resultados promisorios. Sin embargo, se han observado problemas de solubilidad al ser administrados en medio acuoso, debido a la alta hidrofobicidad del anillo ftalocianinico de la molécula. Lo cual implica el uso de solventes orgánicos para poder administrar el compuesto, limitando las concentraciones que se pueden ensayar. Es por ello que se han

²⁰ Wainwright, M., Journal of Antimicrobial Chemoteraphy. 1998; 42:13-28.

²¹ Castano, A. P. , Demidova, T. N., Hamblin, M. R., Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2004, 4:279-293.

²² Buggiani,G., Troiano,M., Rossi,R., Lotti,T., Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2008, 5:134-138

reunido esfuerzos para generar nuevas alternativas que ayuden a mejorar el efecto fototóxico de estas moléculas.

En el presente proyecto se utilizo LDL como vehículo de entrega selectiva del PS, puesto que se ha reportado que la LDL tiene un rol importante en el transporte y liberación de moléculas PS a células proliferantes. Esto se puede explicar por el hecho que las células proliferantes presentan una alta sobreexpresión de receptores LDL en la superficie celular que es regulado por la necesidad de colesterol. La partícula de LDL tiene un diámetro promedio de 22 nm. Están compuestas de: a) un centro lipofílico constituido principalmente de esteres de colesterol y triglicéridos; y b) una monocapa superficial formada por fosfolípidos (esfingomielina, fosfatidil colina y lisofosfatidil colina) y colesterol no esterificado y la apoproteína B100 que posee una fracción de aminoácidos que permite el reconocimiento por el receptor de LDL (ver figura 4).



Figura 4. Estructura de la lipoproteína de baja densidad (LDL)

Para facilitar la incorporación de PS hidrofóbicos dentro de LDL, se han modificado enlazándolos a una cadena alquílica por medio de un enlace sulfoamida. La cadena alquílica se inserta fácilmente dentro del corazón lipídico de la LDL [23]. Así como la modificación con grupos colesteril ester, empleando el método de reconstitución de la LDL en el cual los ésteres de colesterol del centro hidrofóbico de la LDL son reemplazados por el PS-colesteril [24-30].

²³ Urizzi, P.; Allen, C.M.; Langlois, R.; Ouellet, R.; La Madeleine, C.; van Lier, J.E.; J. Porphyrins Phthalocyanines; 2000; 4:1-7.

²⁴ Zheng. G., Li, H., Zhang, M., Lund-Katz, S., Chance, B., Glickson, J.D., Bioconj. Chem. 2002, 13: 392-396.

²⁵ Bonneau, S., Morlière, P., Brault, D., Biochemical Pharmacology 68 (2004) 1443-1452.

²⁶ Lang, K., Mosinger, J., Wagnerová, D. M., Coordination Chemistry Reviews. 2004; 248:321-350.

El uso de lipoproteínas como vehículos de liberación tiene las siguientes ventajas: (i) Dado que las lipoproteínas no son reconocidas por el sistema fagocítico mononuclear, esto proporciona un mayor tiempo de circulación en el plasma y los fluidos biológicos; (ii) su pequeño tamaño (diámetro medio de 10-23 nm) favorece la difusión a través de la membrana vascular; y (iii) su centro apolar constituye un dominio de las drogas lipofílicas, protegiéndolas del ambiente de la sangre durante el transporte. Adicionalmente, la localización del PS en el centro lipofílico de las lipoproteínas no altera su reconocimiento por los receptores celulares. Varios estudios muestran que las LDL pueden ser excelentes transportadores de PS y pueden aumentar la eficiencia y selectividad de los agentes activos [27,28]. Los PS hidrofóbicos se incorporan espontáneamente dentro del corazón lipídico de las lipoproteínas sin cambiar sus propiedades físicas o biológicas (sin alterar el reconocimiento de las LDL por los receptores de LDL) [26].

²⁷ Shaw, J.M.; Shaw, K.V.; Yanovich, S.; Iwanik, M.; Futch, W.S.; Rosowsky, A.; Schook, L.B.; in: R.L. Juliano (Ed.), Biological Approches To the Controlled Delivery of Drugs, Annals of the NY Academy of Sciences, New York, 1987, 253-271.

²⁸ Van Berkel, Th.J.C.; J. Control. Release; 1993; 24:145-155.

2. OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar la actividad foto-tóxica *in vitro* del sistema PS-LDL en Leishmania (*L. panamensis*).

Objetivos específicos:

- Obtener y caracterizar los derivados de ftalocianina metálica;
- Evaluar la actividad foto-tóxica *in vitro* de los derivados de ftalocianina metálica incorporados dentro de LDL contra los parásitos extracelulares intracelulares (amastigotes) de *L. panamensis*.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Síntesis y caracterización de derivados de ftalocianinas metálicas (MPcs)

En el presente proyecto se planteó sintetizar derivados de ftalocianinas metálicas (MPc, M= Zn, Al, Si y Ru) utilizando como ligando común derivados del 5-androsteno-17 β -amino-3 β -il Oleato. Empleado como precursores las ftalocianinas metálicas (figura 5) y realizando posteriormente la modificación de la estructura ftalocianinica con el derivado del 5-androsteno-17 β -amino-3 β -il Oleato correspondiente (figura 6).



Figura 5. Estructuras de ftalocianinas metálicas precursoras



Figura 6. Estructura de los derivados de Colesterol Oleato (5-androsteno-17β-amino-3β-il Oleato).

3.1.1. Síntesis derivado de Ftalocianina de Zinc



Para la obtención del derivado de la ftalocianina de zinc se sintetizó el derivado de la ftalocianina de zinc monosustituido con un grupo carboxílico y el derivado del esteroide con el grupo amino libre el cual es utilizado para unir mediante un enlace amida al anillo ftalocianinico. En la figura 7 se muestra la ruta sintética empleada para la obtención del derivado de ftalocianina de Zinc funcionalizado con el grupo colesterol ester. Se logró sintetizar el compuesto con un rendimiento del 36%.



Figura 7. Ruta sintética para la obtención de ZnPc-CO

Datos de caracterización:

¹**H-RMN** (500 MHz, THF) δ (ppm): 9.5-9.1 (m, 9H; PcH), 8.3-8.2 (m, 3H; PcH), 5.37 (m, 3H, 6-H + 2 x vinil-H del oleato), 4.63 (m, 1H, 3-H), 2.27 (m, 4H), 2.10-2.01 (m,10H) 1.8 (m, 27H; C(CH₃)₃), 1.62 (m, 8H), 1.50-1.38 (m, 2H), 1.40 (s, 9H del tert-butil), 1.37-1.29 (m, 23H), 1.11 (s, 3H, 19-CH₃), 0.98 (t, 3H, terminal CH₃ del oleato), 0.90 (s, 3H, 18-CH₃).

EM (MALDI, ditranol), m/z: 1325.7 [(M+H)⁺]

UV-Vis: (THF), λ_{max} (nm): 672, 607, 349; (CHCl₃); λ_{max} (nm): 702, 6669, 351;



Figura 8. Espectro UV-Vis ZnPc-CO



Figura 9. Espectro ¹H-RMN ZnPc-CO

3.1.2. Síntesis derivado de Ftalocianina de Rutenio



Para la obtención del derivado de la ftalocianina de rutenio se sintetizó el derivado de la ftalocianina de rutenio monosustituido con un grupo carbonilo en posición axial y el derivado del esteroide con el grupo piridina libre el cual se unió directamente al rutenio en la posición axial. En la figura 10 se muestra la ruta sintética empleada para la obtención del derivado de ftalocianina de Zinc funcionalizado con el grupo colesterol ester. Se logró sintetizar el compuesto con un rendimiento del 35%.



Figura 10. Ruta sintética para la obtención de RuPc-CO

Datos de caracterización:

¹**H NMR** (CDCl₃): δ) 9.40, (d, 4H, H Pc), 9.30, (m, 4H, H Pc), 8.15 (4H, H Pc), 5.56 (d, 2H, H piridinicos), 5.32 (m, 3H, 6-H + 2 x vinil-H del oleato), 4.67 (1H, N-H), 4.47 (m, 1H, 3-H), 3.39 (m, 1H, 17-H), 2.25 (m, 6H), 2.18 (d, 2H, H piridinicos), 2.11- 1.59 (m, 11H), 1.78 (s, 36H, tertbutil Pc) 1.59 (m, 18H), 1.26 (s, 3H, 19-CH₃), 0.85 (t, 3H, terminal CH₃ del oleato), 0.21 (s, 3H, 18-CH₃). **UV-Vis:** (CHCl₃)), λ_{max} (nm): 653, 591, 305.



Figura 11. Espectro UV-Vis RuPc-CO



3.1.3. Síntesis derivado de Ftalocianina de Silicio



SiPc-CO (12)

Para la obtención del derivado de la ftalocianina de silicio se utilizó el dicloruro de ftalocianina de silicio comercial (Sigma, 85% de pureza) y el derivado del esteroide funcionalizado con el fenol por el grupo amina el cual fue utilizado para unir mediante el grupo hidroxilo libre al anillo ftalocianinico. Se reportan la ruta sintética empleada (Figura 13) pero al final no fue posible obtener el compuesto deseado. Se van a buscar vías sintéticas alternativas para la obtención del compuesto.



Figura 13. Ruta sintética para la obtención de SiPc-CO

3.1.4. Síntesis derivado de Ftalocianina de Aluminio



Para la obtención del derivado de la ftalocianina de silicio se utilizó el cloruro de ftalocianina de aluminio comercial (Sigma, 85% de pureza) y el derivado del esteroide funcionalizado con el fenol por el grupo amina el cual fue utilizado para unir mediante el grupo hidroxilo libre al anillo ftalocianinico. Se reportan la ruta sintética empleada (Figura 14) pero al final no fue posible obtener el compuesto deseado. Se van a buscar vías sintéticas alternativas para la obtención del compuesto.



Figura 13. Ruta sintética para la obtención de AIPc-CO

3.2. Determinación del efecto fototóxico de las MPcs

Se sintetizaron dos nuevos derivados de ftalocianinas de Zinc y Rutenio funcionalizados con una molécula de colesterol oleato (ZnPc-CO y RuPc-CO). Estos compuestos fueron usados incorporados dentro de la particular de LDL a través de incubación directa y su actividad fototóxica fue evaluada en células THP-1 y amastigotes intracelulares de *L. panamensis*, irradiados a una dosis de luz de 5 J/cm² y λ = 400-700 nm. La toxicidad fue calculada después de 72 h o 24 h (para parásitos de *L. panamensis* y células THP-1, respectivamente) y los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición de la infección para los parásitos y crecimiento para las células a la concentración de ftalocianina usada en cada experimento. Cabe resaltar que también fueron estudiados los compuestos sin ser incorporados previamente en la partícula de LDL.

3.2.1. Ensayos en macrófagos (Células. THP-1)

En la Figura 14., se muestran los resultados de fototóxicidad de los compuestos bajo estudio en células THP-1. De acuerdo a los resultados encontrados, todos los compuestos estudiados presentan mayor % de inhibición del crecimiento de las células THP-1 en presencia de luz (Figura 14: C y D).

Las ftalocianinas precursoras presentaron mayor % de inhibición del crecimiento de las células THP-1 al ser irradiadas que los derivados con el grupo ester de colesterol (Figura 14C). Se observo que al incorporar los compuestos dentro de la LDL se incremento su efecto fototóxico, alcanzando un mayor % de inhibición del crecimiento de las células THP-1 a concentraciones más bajas (Figura 14D).



Figura 14. Resultados de los ensayos de fototóxicidad en células THP-1

3.2.2. Ensayos de fototóxicidad en amastigotes intracelulares

En la Figura 15., se muestran los resultados de fototóxicidad de los compuestos bajo estudio en células THP-1.



Figura 15. Resultados de los ensayos de fototóxicidad en amastigotes intracelulares de L. panamensis

De acuerdo a los resultados encontrados, todos los compuestos estudiados presentan mayor % de inhibición de la infección en presencia de luz (Figura 15: C y D).

ZnPc-COOH presento un mayor % de inhibición de la infección que ZnPc-CO, contrario a lo observado con RuPc-CO que presento un mayor % de inhibición de la infección que la ftalocianina precursora Ru(CO)Pc (Figura 15C). Se observo que al incorporar los compuestos dentro de la LDL se incremento su efecto fototóxico, alcanzando un mayor % de inhibición de la infección a la misma concentración (para ZnPc-CO y RuPc-CO la concentración fue 5 μ M; para ZnPc-COOH y Ru(CO)Pc fue 1,6 μ M; Figura 15: C y D).

3.3. Internalización de las MPcs en macrófagos

Se determino la internalización de la MPc mediante la cuantificación por método fluorimetrico de la concentración de presente en las células THP-1 luego del tiempo de incubación. Los compuestos Ru(CO)Pc y RuPc-CO no presentaron florescencia bajo las condiciones del método empleado por lo tanto no se pudieron analizar. Se determino la concentración de ZnPc-COOH y ZnPc-CO y se expreso como nmol MPc/ mg de proteína.

3.3.1. Cuantificación de los compuestos internalizados

En la figura 16., se muestran los resultados encontrados en los ensayos de internalización de ZnPc-COOH y ZnPc-CO, luego de incubar las células con una solución 5.66 μ M de ZnPc-CO ó 2,60 μ M de ZnPc-COOH (2% THF/ PBS).

Se utilizaron como blancos las células THP-1 sin adicionar compuesto y adicionando una solución de 2% THF/PBS. ZnPc-COOH fue internalizada en mayor proporción en las células THP-1 que ZnPc-CO en el intervalo de tiempo evaluado. Se observa que para ZnPc-COOH y ZnPc-CO la mayor incorporación del compuesto se llevo a cabo a las 24 h (Figura 16: A y B).

La concentración de MPc máxima incorporada en las células TPH-1 en los intervalos de tiempo estudiados fue expresada como nmol MPc / mg proteína. Encontrándose una máxima concentración de 18,33 nmol/ mg proteína para ZnPc-COOH y 1,78 nmol/ mg proteína para ZnPc-CO. Como se puede observar la ZnPc-COOH se incorpora casi 10 veces más que ZnPc-CO (Figura 16C). Estos datos están en concordancia con los resultados de fototóxicidad encontrados.





4. CONCLUSIONES

Se sintetizaron dos nuevos derivados de ftalocianinas de Zinc y Rutenio funcionalizados con una molécula de colesterol oleato (ZnPc-CO y RuPc-CO) y se estudio su actividad fototóxica contra *L. panamensis*.

Se encontró que las células THP-1 son más sensibles al tratamiento con los nuevos derivados ftalocianinicos que las células infectadas con *L. panamensis*. No se observó una selectividad hacia las células infectadas. Los porcentajes de inhibición del crecimiento celular en los macrófagos fueron mayores para las ftalocianinas precursoras que para los derivados funcionalizados con la molécula de colesterol ester.

Para el caso de los derivados de ftalocianina de Zinc (II) se comprobó mediante estudios de internalización celular que hay un mayor ingreso de la ftalocianina precursora (ZnPc-COOH) que de ZnPc-CO en las células THP-1. Esto debido a que el voluminoso tamaño de ZnPc-CO y su alta hidrofobicidad impide el transito libre a través de las membranas del macrofago. En contraste, el empleo de LDL como vehículo de liberación selectiva favorece la internalización de los derivados funcionalizados con la molécula de colesterol ester; lo cual concuerda los valores de % de inhibición de crecimiento celular encontrados.

Se observo que al incorporar los compuestos dentro de la LDL se incremento su efecto fototóxico, alcanzando un mayor % de inhibición de la infección a la misma concentración (para ZnPc-CO y RuPc-CO la concentración fue 5 μ M; para ZnPc-COOH y Ru(CO)Pc fue 1,6 μ M.

Los compuestos ZnPc-CO y RuPc-CO al tener una alta hidrofobicidad presentan inconvenientes al momento de preparar las disoluciones de trabajo, limitando el rango de concentración en el que pueden ser ensayadas.

Se recomienda realizar estudios de expresión de receptores LDL en las células infectadas con *L. panamensis* a fin de corroborar si el uso de la LDL como vehículo de entrega selectiva de los PS es una estrategia viable. Recientemente se ha demostrado que *L. amazonensis* es capaz de adquirir e internalizar LDL. Además el colesterol libre de las partículas de LDL es esterificado por estos parásitos [29].

²⁹ De Cicco, N.N.T., et al., Experimental Parasitology, 2012, 130(4), 330–340.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Materiales y Métodos

<u>Cromatografía en capa fina:</u> El seguimiento de las reacciones se llevó empleando cromatofolios de gel de sílice (*Merck*-60 230-400 mesh) de 0.2 mm sobre aluminio. El análisis de las placas se llevó a cabo en una lámpara de UV de 254 y 365 nm.

<u>Reactivos y Disolventes</u>: Los reactivos empleados en toda este trabajo se adquirieron comercialmente (Aldrich, Chemical Co., Acros) y se utilizaron sin ninguna purificación adicional. Los disolventes utilizados (SDS) se emplearon en calidad "grado de síntesis" para las reacciones químicas, en "grado HPLC" para la purificación por cromatografía en columna y en "grado anhidro" para reacciones en ausencia de agua.

<u>Resonancia magnética nuclear (RMN)</u>: Los espectros de ¹H-RMN, se realizaron en un equipo Bruker AC-300 (300 MHz). Los desplazamientos químicos (δ) se dan en ppm, tomando como referencia el tetrametilsilano (TMS). Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.

Espectroscopía UV-visible: los espectros fueron obtenidos con un equipo Hewlett-Packard 8453.

<u>Espectrometría de masas</u>: La espectrometría de masas (EM) se efectuó la técnica MALDI-TOF con un espectrómetro Bruker REFLEX III (láser a 337 nm) y ditranol (1,8,9-antracenotriol) como matriz, ambos efectuados en el SIdI de la Universidad Autónoma de Madrid. Los datos de masa se expresan en unidades m/z.

5.2. Síntesis de ftalocianinas metálicas precursoras

Las ftalocianinas de Silicio y Aluminio (SiPcCl₂, AlPcCl) se obtuvieron comercialmente (Aldrich), las ftalocianinas de Zinc [30] y Rutenio ³¹fueron obtenidas (ZnPc-COOH y Ru(CO)Pc) por los métodos desarrollados previamente en nuestro grupo de investigación.

5.3. Síntesis de los derivados de Colesterol Oleato

5.3.1. Síntesis 5-Androsteno-17β-amino-3β-il Oleato



³⁰ Cid, J.-J.; Yum, J.-H.; Jang, S.-R.; Nazeeruddin, M. K.; Martínez-Ferrero, E.; Palomares, E.; Ko, J.; Grätzel, M.; Torres, T. Angew Chem Int Ed 2007, 46, 8358.

³¹ Rodríguez-Morgade, M. S., Torres, T, Atienza-Castellanos, C, Guldi, D. M. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 15145-15154.

• 5-Androsteno-17β -Boc-amino-3β-ol



Di-tert-butil carbonato fue adicionado (1.51 g, 6.9 mmol) a una solución que contenía 5-androsteno-17 β -amino-3 β -ol (1.00 g, 3.45 mmol) y trietilamina (0.72 mL, 5.17 mmol) en diclorometano (100 mL). La mezcla de reacción se agito a temperatura ambiente durante 2 días. La evaporación del solvente genero un residuo blanco. El crudo de reacción fue purificado por cromatografía en columna de silica gel empleando como eluyente una mezcla hexano: acetato de etilo (7: 3). Se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento del 97 %.

Punto de fusión: 168-172 °C; ¹H NMR (CDCl₃): δ 5.35 (m, 1H, 6-H), 4.41 (brs, 1H, N-H), 3.53 (m, 2H, 3-H + 17-H), 2.27 (m, 2H), 2.35-2.19 (m, 2H), 2.17-1.91 (m, 4H), 1.88-1.63 (m, 4H), 1.53-1.38 (m, 3H), 1.45 (s, 9H for *tert*-butyl), 1.31-1.15 (m, 2H), 1.15-0.95 (m, 2H), 1.02 (s, 3H, 19-CH₃), 0.67 (s, 3H, 18-CH₃).

5-Androsteno-17ß -Boc-amino-3ß-il oleato



Se mezclo a temperatura ambiente en CH_2Cl_2 5-androsteno-17 β -Boc-amino-3 β -ol (300 mg, 0.77 mmol), ácido oleico (327.6 mg, 1.16 mmol) y 4-(dimetilamino)piridina (65.97 mg, 0.54 mmol) en 30 mL de CH_2Cl_2 hasta que la solución se hizo homogénea. Posteriormente se adicionó en frío N,N'diciclohexil carbodiimida (239.34 mg, 1.16 mmol) a la mezcla de reacción lentamente. Se continúo con la agitación en frío durante 30 minutos. Luego se mantuvo la agitación a temperatura ambiente y bajo atmosfera de argón durante 24 h. Se monitoreo el progreso de la reacción por TLC. La mezcla de reacción fue filtrada para eliminar el exceso de DCC urea formada, el filtrado resultante contenía el producto deseado, luego se evaporo a presión reducida para eliminar el solvente. El crudo de reacción fue purificado por cromatografía en columna de silica gel empleando como eluyente una mezcla cloroformo: acetato de etilo (99: 1). Se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento del 90 %. ¹H NMR (CDCl₃): δ 5.32 (m, 3H, 6-H + 2 x vinil-H del oleato), 4.61 (m, 1H, 3-H), 4.41 (brs, 1H, N-H), 3.57 (m, 1H, 17-H), 2.27 (m, 4H), 2.17-1.70 (m,10H), 1.62 (m, 8H), 1.50-1.38 (m, 2H), 1.44 (s, 9H del tert-butil), 1.37-0.95 (m, 23H), 1.03 (s, 3H, 19-CH₃), 0.88 (t, 3H, terminal CH₃ del oleato), 0.68 (s, 3H, 18-CH₃)

• 5-Androsteno-17β -amino-3β-il oleato



5-Androsteno-17 β -Boc-amino-3 β -il oleato (50 mg, 0.076 mmol) fue disuelto en 10 mL CH₂Cl₂ y se adiciono posteriormente a 0°C ácido trifluoroacético (1.72 mL, 0.022 mol), la mezcla de reacción se mantuvo con agitación constante y a temperatura ambiente durante 2.5 h. Luego se adiciono a la mezcla una solución saturada de Na₂CO₃ (3 x 10 mL) hasta neutralizar. Se separo la fase orgánica y se rotoevaporó generándose el producto deseado con un rendimiento del 80 %. El producto fue utilizado para la siguiente etapa de síntesis sin ninguna purificación posterior.

5.3.2. 5-Androsteno-17 β -isonicotinamida-3 β -il oleato



El compuesto se obtuvo mediante la reacción del 5-Androsteno-17 β -amino-3 β il oleato y el isonicotinoil cloruro hidrocloruro, el cual fue previamente preparado y usado sin ninguna purificación posterior.

• Síntesis del isonicotinoil cloruro hidrocloruro



Se adiciono 0.93 mL de cloruro de tionilo a una mezcla de ácido isonicotinico (400 mg; 3.24 mmol) y DMF (0.02 mL; 0.21 mmol) con agitación constante, después de 30 minutos toda la mezcla quedo en solución, se continúo la agitación durante 1 h. El exceso de cloruro de tionilo fue removido al vacío. Se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento del 98 %. El producto fue utilizado en la siguiente etapa sin ninguna purificación posterior.



Se adiciono isonicotinoil cloruro hidrocloruro (32.04 mg; 0.18 mmol) a una mezcla de 5-androsteno-17 β -amino-3 β -il oleato (68.1 mg; 0.12 mmol) y Et₃N (0.050 mL; 0.36 mmol) en 5 mL de CH₂Cl₂. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente y bajo atmosfera de argón durante 40 h, tiempo en el cual se consumió todo el reactivo de partida. Se rotoevaporo la mezcla de reacción y se purifico por cromatografía en columna de silica gel empleando como eluyente la mezcla 20% MeOH en CH₂Cl₂. Se obtuvo un aceite amarillo con un rendimiento del 85.9%.

¹H NMR (CDCl₃): δ) 8.73, (singulete, 2H, H piridinicos), 7.60, (singulete, 2H, H piridinicos), 6.08 (1H, N-H), 5.33 (m, 3H, 6-H + 2 x vinil-H del oleato), 4.60 (m, 1H, 3-H), 4.11 (m, 1H, 17-H), 2.25 (m, 6H), 2.10-1.99 (m,6H), 1.62 (m, 10H), 1.50-1.38 (m, 2H), 1.37-1.29 (m, 23H), 1.03 (s, 3H, 19-CH₃), 0.87 (t, 3H, terminal CH₃ del oleato), 0.79 (s, 3H, 18-CH₃).

5.4. Síntesis de ftalocianinas metálicas funcionalizadas con la molécula de colesterol ester (MPc-CO)





5-Androsteno-17β-amino-3β-il oleato (29 mg, 0.052 mmol), TT1 (45.15 mg, 0.57 mmol) y HOBT (8.10 mg, 0.060 mmol) fueron disueltos en 6 mL CH₂Cl₂ y se adiciono posteriormente a 0°C DCC (12.87 mg, 0.062 mol), la mezcla de reacción se mantuvo con agitación constante y a temperatura ambiente durante 18 h. La evaporación del solvente genero un residuo azul. El crudo de reacción fue purificado por cromatografía en columna de silica gel empleando como eluyente una mezcla hexano: dioxano (3:1). Se realizo una posterior purificación por GPC utilizando THF como eluyente. Se obtuvo un sólido azul con un rendimiento del 35.99 %.

5.4.2. Derivado de Ftalocianina de Rutenio (II)



Se adicionó 5-Androsteno-17 β -isonicotinamida-3 β -il oleato (62.7 mg, 0.095 mmol) a una solución de [Carbonil-2(3),9(10),16(17),23(24)-tetrakis-tertbutilftalocianinato]Ru(II) (89.90 mg, 0.104 mmol) en 5 mL de THF. La temperatura se aumento gradualmente hasta 50 °C y se mantuvo la reacción con agitación constante bajo atmosfera de argón a dicha temperatura durante 18 h. Se monitoreo el avance de la reacción por TLC. Transcurrido el tiempo de reacción se dejo enfriar a temperatura ambiente y luego se rotoevaporó para eliminar el solvente generándose un sólido de color azul intenso. El compuesto se purifico por cromatografía de permeación en gel utilizando como eluyente THF. Obteniéndose el compuesto deseado con un rendimiento del 35.5 %.

5.5. Determinación del efecto fototóxico de las MPcs

• Ensayos de toxicidad en células THP-1

Células THP-1 fueron tratadas durante 24 horas con los compuestos en cuatro concentraciones por triplicado (máximo 30 µM debido a la solubilidad). Posteriormente las células fueron irradiadas y después de 24 horas se determinó la toxicidad por el método colorimétrico de MTT. Realizar la lectura en 580 nm. Células controles fueron mantenidas en oscuridad. Los resultados fueron expresados como % de inhibición del crecimiento celular.

• Ensayo de inhibición en amastigotes intracelulares de *L. panamensis*

Amastigotes intracelulares de *L. panamensis* infectando células THP-1 fueron tratadas durante 24 horas con los compuestos (Máximo 15 uM). Posteriormente las células fueron irradiadas y después de 72 horas se determinó la actividad de los compuestos por recuento microscópico en células fijadas con metanol y

coloreadas con Giemsa. Los resultados fueron expresados como % de inhibición de la infección.

• Ensayo internalización de ftalocianinas por fluorometria

Las células fueron tratadas con las MPc a una sola concentración y se incubaron durante 3, 6, 10 y 24 horas. Células control fueron dejadas sin MPc. Luego se determinó la concentración de proteínas por Bradford y la concentración de MPc por fluorometria. Se realizaron dos experimentos. Los resultados fueron expresados en mg/mL, se presentan en la Figura 16C. La concentración de Pc es mostrada en la Figura16: A y B, los resultados fueron expresados en μ M.