

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: QUÍMICA MEDICINAL

**“SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE PORFIRINAS DE INTERÉS
TERAPÉUTICO”**

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

ANTONIO DE JESÚS VEGA MEDINA
MATRÍCULA: 2152800338

COMITÉ TUTORAL

TUTOR: DR. CUAUHTÉMOC PÉREZ GONZÁLEZ
ASESOR: DRA. JULIA PÉREZ RAMOS
ASESOR: DRA. SALUD PÉREZ GUTIÉRREZ

MAYO, 2017

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE PORFIRINAS DE INTERÉS
TERAPÉUTICO**

Comité tutorial

Vo.Bo

Dr. Cuauhtémoc Pérez González

Vo.Bo

Dra. Julia Pérez Ramos

Vo.Bo

Dra. Salud Pérez Gutiérrez

QFB. Antonio de Jesús Vega Medina

2152800338

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE PORFIRINAS DE INTERÉS
TERAPÉUTICO**

Jurado del examen de grado

Vo.Bo Presidente

Dr. Raúl Enríquez Habib

Vo.Bo Vocal

Dr. Ángel Josabad Alonso Castro

Vo.Bo Secretario

Dr. Cuauhtémoc Pérez González

Agradecimientos Institucionales

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana por haberme permitido el uso de sus instalaciones y recursos para tomar clases y realizar este proyecto de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de mi beca de manutención (No. 578479).

Agradecimientos

A mis padres: por todo lo que me han brindado y su apoyo incondicional ante cualquier situación.

A mi hermano: por todos los buenos momentos que hemos pasado y su apoyo incondicional.

A Ivonne: por todo su cariño, compañía, paciencia y apoyo brindado hasta en los momentos más difíciles. También a sus papás y hermanos por el apoyo brindado.

A mis amigas Tania y Kary: por haberme recibido en su casa y brindado su amistad cuando llegué a la Ciudad de México.

A José Luis y Pati: por su gran amistad, apoyo y enseñanzas de vida.

A mis grandes amigos de Guanajuato: Heder y Sierra, por su gran amistad y buenos momentos durante mi estancia en Guanajuato.

A mis amigos de la UAM-X: Poncho, Viridiana, Rogelio, Abraham y demás, por su compañía y apoyo durante el transcurso del posgrado.

A mi primo Daniel: por su amistad, consejos y buenos momentos desde la infancia.

En memoria de mi hermano Alberto.

Abreviaturas

EROs: Especies reactivas de oxígeno
TFD: Terapia fotodinámica
MeOH: Metanol
Py: Piridina
BF₃·OEt₂: Aducto eterato de trifluoruro de boro
TFA: Ácido trifluoroacético
DDQ: 2,3-Dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
H⁺: Protón
DMF: N,N-dimetilformamida
TFP: 5,10,15,20-Tetrafenilporfirina
ADN: Ácido desoxirribonucleico
VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana
VPH: Virus del Papiloma Humano
VHB: Virus de la Hepatitis B
O₂⁻: Radical superóxido
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
OH⁻: Radical hidroxilo
¹O₂: Oxígeno singlete
nm: Nanómetro
ATP: Adenosín trifosfato
LDL: Lipoproteína de baja densidad
HDL: Lipoproteína de alta densidad
mg: Miligramo
Kg: Kilogramo
mm: Milímetro
λ: Longitud de onda
MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
IMR 32: Línea celular de neuroblastoma caucásico humano
MCF-7: Línea celular de cáncer de mama
MDA-MB-231: Línea celular de adenocarcinoma de mama caucásico humano
RGD: Ácido arginilglicilaspártico
K-562: Línea celular de leucemia mielógena crónica humana
HeLa: Línea celular de carcinoma epitelioide del cuello uterino humano
HaCat: Línea celular de queratinocitos inmortalizados humanos
μL: Microlitro
min: Minuto
¹HRMN: Resonancia magnética nuclear de protón
CDCl₃: Cloroformo deuterado
DMSO-d₆: Dimetilsulfóxido deuterado
TMS: Tetrametilsilano
LED: Diodo emisor de luz
V: Volt
m: Metro
J: Joule
m²: Metro cuadrado
cm: Centímetro
MHz: Megahertz
Hz: Hertz
OHTFP: 5,10,15,20-Tetrakis(4-Hidroxifenil)porfirina
TFP: 5,10,15,20-Tetrafenilporfirina
FTFP: 5,10,15,20-Tetrakis(4-fluorofenil)porfirina
CITFP: 5,10,15,20-Tetrakis(4-clorofenil)porfirina
BrTFP: 5,10,15,20-Tetrakis(4-bromofenil)porfirina
Zn-OHTFP: Zn(II) 5,10,15,20-Tetrakis(4-hidroxifenil)porfirina
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
PBS: Buffer fosfato salino
μM: Micromolar
IC₅₀: Concentración inhibitoria media
E.E.: Error estándar
ppm: Partes por millón
CYP450: Citocromo P450
Ph: Grupo fenilo
ANOVA: Análisis de varianza

Índice

1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1. Porphirinas	2
2.2. Síntesis de porfirinas	4
2.3. Cáncer	12
2.3.1. Etiología del cáncer	12
2.3.2. Cáncer cervicouterino	13
2.3.3. Tratamientos	15
2.4. Terapia fotodinámica	15
2.4.1. Mecanismo de fototoxicidad	16
2.4.2. Citotoxicidad selectiva	17
2.4.3. Evolución de los fotosensibilizadores	18
3. Antecedentes	21
4. Hipótesis	23
5. Objetivos	23
5.1. Objetivo general	23
5.2. Objetivos particulares	23
6. Metodología	24
6.1. Reactivos	24
6.2. Síntesis de porfirinas	24
6.3. Caracterización de las porfirinas sintetizadas	25
6.4. Construcción del sistema de iluminación	25
6.5. Estudios de citotoxicidad intrínseca y fototoxicidad <i>in vitro</i>	25
7. Resultados	27
7.1. Elucidación estructural de las porfirinas sintetizadas mediante ¹ HRMN y espectrofotometría UV-Visible	27
7.2. Ensayos <i>in vitro</i>	41
7.2.1. Estandarización de la metodología para la determinación de la citotoxicidad intrínseca y la fototoxicidad	41

7.2.2. Determinación de la citotoxicidad intrínseca y la fototoxicidad de Zn-OHTFP.....	43
7.2.3. Comparación del efecto citotóxico intrínseco y fototoxicidad de OHTFP y Zn-OHTFP	45
8. Discusión.....	46
8.1. Elucidación estructural	46
8.2. Análisis químico farmacéutico de TFP, FTFP, CITFP y BrTFP.....	55
8.3. Efecto de los sustituyentes <i>para</i> del grupo fenilo en la banda I de las porfirinas en su forma de base libre y citotoxicidad intrínseca y fototoxicidad ejercida por OHTFP y Zn-OHTFP	56
9. Conclusiones	58
10. Bibliografía	59

Índice de tablas

Tabla 1. Valores de IC₅₀ de la OHTFP a diferentes tiempos de radiación.....40

Tabla 2. Valores de IC₅₀ de la Zn-OHTFP a diferentes tiempos de radiación.....41

Tabla 3. Comparaciones de los valores de IC₅₀ de OHTFP y Zn-OHTFP a diferentes tiempos de radiación.....43

Índice de figuras

Figura 1. Estructura de las porfirinas y sus posibles posiciones de sustitución.

Figura 2. Reacción de metalación de porfirinas para la formación de metaloporfirinas. a. Proceso de metalación. b. Proceso de desmetalación.

Figura 3. Síntesis de la *meso*-tetrametilporfirina.

Figura 4. Síntesis de la *meso*-tetrafenilporfirina.

Figura 5. Síntesis de la *meso*-tetrafenilporfirina utilizando el método de Adler.

Figura 6. Método de Lindsey.

Figura 7. Síntesis MacDonald [2+2].

Figura 8. Estructura de dipirrilmetanos. a) simétrico y b) asimétrico

Figura 9. Síntesis habitual de dipirrilmetano.

Figura 10. Síntesis de dipirrilmetanos empleando catálisis ácida.

Figura 11. Porfirinas asimétricas obtenidas por condensación 2+2.

Figura 12. Derivados de ftalocianinas y clorinas. Tomada de Fong *et al.* 79.

Figura 13. Espectro de ¹HRMN para la TFP a 600 MHz en CDCl₃. A. Se muestran todas las señales de interés. B. Esta expansión muestra la presencia de un doblete y un múltiple con su respectiva constante de acoplamiento.

Figura 14. Espectro de absorción UV-Visible de la TFP en CHCl₃ a una concentración de 0.1 mg/mL.

Figura 15. Espectro de $^1\text{HRMN}$ para la FTFP a 600 MHz en CDCl_3 . A. Se muestran todas las señales de interés. B. Esta expansión muestra la presencia de dos dobles con su respectiva constante de acoplamiento.

Figura 16. Espectro de $^1\text{HRMN}$ para la CITFP a 600 MHz en CDCl_3 . Se muestran todas las señales de interés. B. Este acercamiento muestra la presencia de dos dobletes con su respectiva constante de acoplamiento.

Figura 17. Espectro de $^1\text{HRMN}$ para la BrTFP a 600 MHz en CDCl_3 . Se muestran todas las señales de interés. B. Este acercamiento muestra la presencia de dos dobletes con su respectiva constante de acoplamiento.

Figura 18. Espectro de $^1\text{HRMN}$ para la OHTFP a 600 MHz en DMSO-d_6 . Se muestran todas las señales de interés. B. Este acercamiento muestra la presencia de dos dobles con su respectiva constante de acoplamiento.

Figura 19. Espectro de $^1\text{HRMN}$ para la Zn-OHTFP a 600 MHz en DMSO-d_6 . Se muestran todas las señales de interés. B. Este acercamiento muestra la presencia de dos dobletes con su respectiva constante de acoplamiento.

Figura 20. Espectro de absorción UV-Visible de la Zn-OHTFP en MeOH a una concentración de 0.1 mg/mL.

Figura 21. Porcentaje de viabilidad celular obtenido con células HeLa en función de distintas concentraciones de OHTFP y tiempos de exposición a la luz roja.

Figura 22. Las barras representan los valores de IC_{50} obtenidos 24 horas después de aplicar luz roja durante 0, 15, 30 y 60 minutos.

Figura 23. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en función de distintas concentraciones de Zn-OHTFP y tiempos de exposición a la luz roja.

Figura 24. Las barras representan los valores de IC_{50} obtenidos 24 horas después de aplicar luz roja durante 0, 15 y 30 minutos.

Figura 25. Las barras representan los valores de IC_{50} de OHTFP y Zn-OHTFP, obtenidos 24 horas después de aplicar luz roja durante 0, 15 y 30 minutos.

Figura 26. Hidrógenos del grupo fenilo.

Figura 27. Estructura de la TFP.

Figura 28. Hidrógenos de grupo fenilo *para*-sustituido.

Figura 29. Estructura de la FTFP.

Figura 30. Estructura de la CITFP.

Figura 31. Estructura de la BrTFP.

Figura 32. Estructura de la OHTFP.

Figura 33. Estructura de la Zn-OHTFP

1. Introducción

Las porfirinas son compuestos macrocíclicos formados por cuatro anillos de pirrol unidos entre sí por puentes metino. Son capaces de formar complejos metálicos con una amplia variedad de cationes metálicos (1, 2). Se les puede encontrar ampliamente distribuidas en la naturaleza participando en procesos esenciales como la fotosíntesis, biocatálisis o almacenamiento y transporte de gases (3). Los organismos vivos poseen la capacidad de llevar a cabo la biosíntesis de estos compuestos. Por ejemplo, el grupo hemo de la hemoglobina es sintetizado a partir del ácido 5-aminolevulínico, un metabolito presente en casi todas las células de mamíferos, a través de un proceso multienzimático (4).

Las porfirinas han sido ampliamente utilizadas en la terapia fotodinámica para el cáncer debido a ciertas características que poseen. Por ejemplo, tienden a acumularse mayoritariamente en células tumorales, además, son capaces de producir especies reactivas de oxígeno (EROs) al absorber radiación electromagnética (luz roja) y presentar efecto citotóxico (5, 6). La terapia fotodinámica (TFD) es una modalidad terapéutica que requiere de tres componentes esenciales para poder ejercer su efecto terapéutico: un fotosensibilizador, radiación electromagnética con adecuada longitud de onda y oxígeno (5, 7). Desde su primera aplicación clínica para el cáncer de vejiga en 1976 (8), ha sido utilizada para otras neoplasias tales como cáncer de piel (9), cáncer de próstata (10) o cáncer cervicouterino, mostrando un importante potencial terapéutico en este último (11).

Debido a que diversos ensayos clínicos han demostrado que esta terapia puede ser eficaz, principalmente en estadios tempranos del cáncer, además de prolongar la supervivencia y mejorar la calidad de vida de los pacientes con cánceres inoperables, aunado a las mejoras tecnológicas, la TFD tiene el potencial para pasar de una terapia alternativa a una de las terapias usuales para el cáncer (12).

2. Marco teórico

2.1. Porfirinas

Las porfirinas están ampliamente involucradas en procesos vitales esenciales llevados a cabo en los organismos vivos. Algunos de estos procesos son el transporte y almacenamiento de oxígeno, la fotosíntesis, el transporte de electrones y la biotransformación de fármacos. Debido a la diversidad de actividades biológicas y propiedades tanto físicas como químicas de estos compuestos, la comunidad científica se ha interesado en su estudio desde hace varias décadas (13), dando como resultado una gran gama de aplicaciones de estos compuestos preparados por síntesis, abarcando diversas disciplinas, por ejemplo la biocatálisis, la construcción de celdas fotovoltaicas y el desarrollo de agentes fotosensibilizantes para la TFD para el cáncer (14).

La estructura de las porfirinas está conformada de cuatro anillos pirrólicos unidos mediante puentes metino (**Figura 1**, #1). Los átomos de nitrógeno ubicados en su interior actúan como ligandos ya que pueden enlazar firmemente átomos metálicos. Estas unidades son susceptibles a modificaciones debido a la incorporación de sustituyentes en las posiciones β del pirrol (posición β) (#2) o a sus puentes metino (posición *meso*) (#3). Algunas porfirinas pueden contener un átomo metálico en el centro unido mediante enlaces de coordinación, como es el caso del grupo hemo de la hemoglobina, la clorofila a y la vitamina B12 (3).

Estos macrociclos presentan aromaticidad ya que obedecen a la regla de Hückel al tener $4n+2$ electrones π en un sistema conjugado plano y cíclico. Contienen un total de 22 electrones π , de los cuales 18 participan en el sistema de resonancia. Existe una variación en el grado de reactividad de las 12 posiciones que se encuentran en la periferia, las cuales son susceptibles a sufrir sustituciones. Debido a la aromaticidad que presenta el macrociclo de porfirina, estos compuestos tienden a llevar a cabo principalmente reacciones de sustitución

electrofílica o radicalaria, mientras que dos de sus puentes metino pueden reaccionar de manera diferente bajo ciertas condiciones debido a que los electrones de sus dobles enlaces no participan en el sistema de resonancia (15).

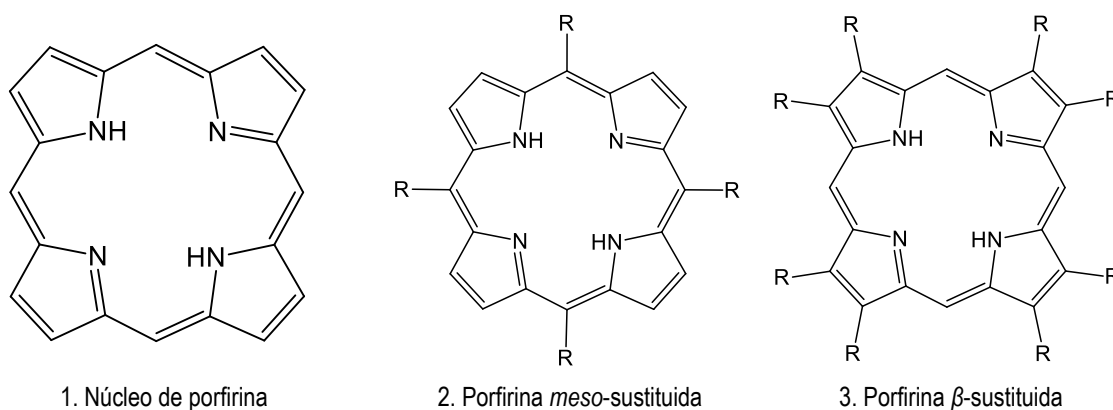


Figura 1. Estructura de las porfirinas y sus posibles posiciones de sustitución.

Los átomos de nitrógeno centrales de las porfirinas son capaces de formar enlaces con átomos metálicos por la pérdida de sus protones (**Figura 2**). Los compuestos generados reciben el nombre de metaloporfirinas (#4). Se trata de un proceso reversible y casi todos los metales y algunos metaloides han podido ser insertados con éxito (15, 16).

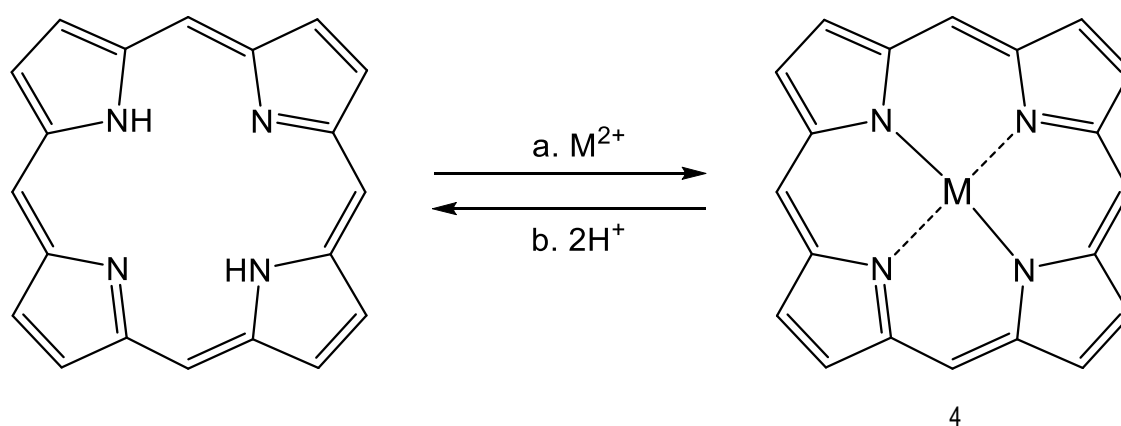


Figura 2. Reacción de metalación de porfirinas para la formación de metaloporfirinas. a. Proceso de metalación. b. Proceso de desmetalación.

2.2. Síntesis de porfirinas

Antes de llevar a cabo la síntesis de porfirinas es fundamental que se tengan bien establecidos los patrones de sustitución de la periferia del macrociclo. Mientras que ciertos sustituyentes pueden ser añadidos en las posiciones *meso* después de la formación del núcleo de porfirina, otros deben estar unidos a las posiciones β del pirrol desde un inicio. Para lograr esto es necesario un adecuado análisis retrosintético que permita determinar la mejor metodología de síntesis en función de la obtención de buenos rendimientos y/o ruta más conveniente.

Los tres factores más importantes para el diseño de una ruta sintética son (2):

- 1) La naturaleza de los sustituyentes; por lo general, la mayoría de sustituyentes de heteroátomos como los halógenos, grupos nitro y ácido sulfónico pueden ser introducidos con relativa facilidad al núcleo de porfirina debido a su naturaleza electrofílica o radicalaria. Por otro lado, los sustituyentes con carbono unido directamente al macrociclo, tales como grupos alquilo o arilo, así como sus derivados, usualmente deben ser incorporados antes o durante la formación del macrociclo.
- 2) Posición de los sustituyentes (posiciones β o *meso*); si se quiere llevar a cabo la sustitución en las posiciones β del pirrol, es necesario sintetizar previamente las unidades de pirrol con los sustituyentes requeridos a partir de precursores acíclicos.
- 3) La simetría general de la molécula; los sistemas simétricos pueden ser obtenidos con rutas de síntesis de uno o dos pasos, mientras que sistemas más complejos como los presentes en la naturaleza pueden obtenerse con múltiples pasos.

Los estudios tanto de la obtención como de la estructura de las porfirinas tuvieron su auge durante el periodo de 1920 a 1930. Las investigaciones de Hans Fischer dejaron huella en la historia de la química de estos compuestos al punto que lo

llevaron a ganar el Premio Nobel en 1930 por sus trabajos de la elucidación estructural de la clorofila y la protohemina, pero, sobre todo, por la síntesis total de esta última (13).

Rothemund fue pionero en la síntesis de porfirinas *meso*-sustituidas. En 1935 logró obtener la *meso*-tetrametilporfirina (**Figura 3**, #5) haciendo reaccionar, en recipientes sellados, acetaldehído y pirrol en metanol a alta temperatura (17). También sintetizó porfirina reaccionando pirrol y formaldehído, así como complejos de cobre de *meso*-tetrametilporfirina y porfirina (18). Años más tarde logró obtener la *meso*-tetrafenilporfirina (**Figura 4**, #6) reaccionando pirrol y benzaldehído en piridina a 220°C por 28 horas (19), además de sus respectivos complejos metálicos (20). La metodología de Rothemund suele dar rendimientos alrededor del 5% (21).

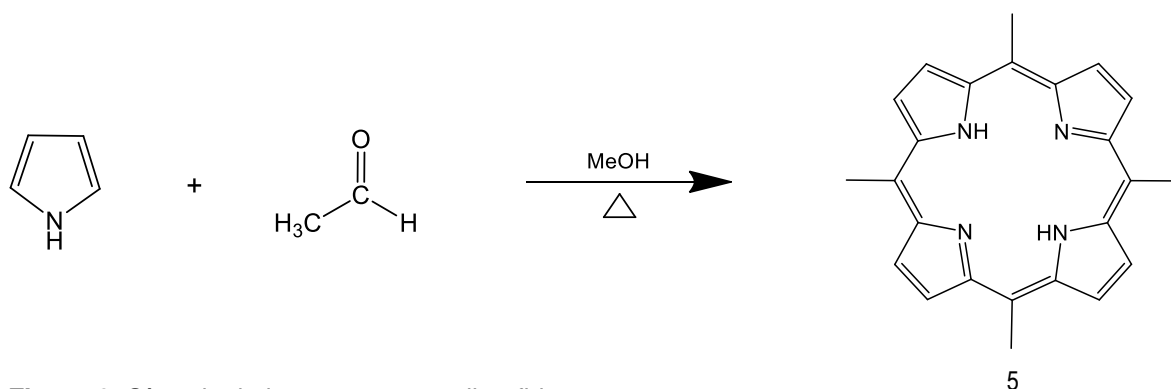


Figura 3. Síntesis de la *meso*-tetrametilporfirina.

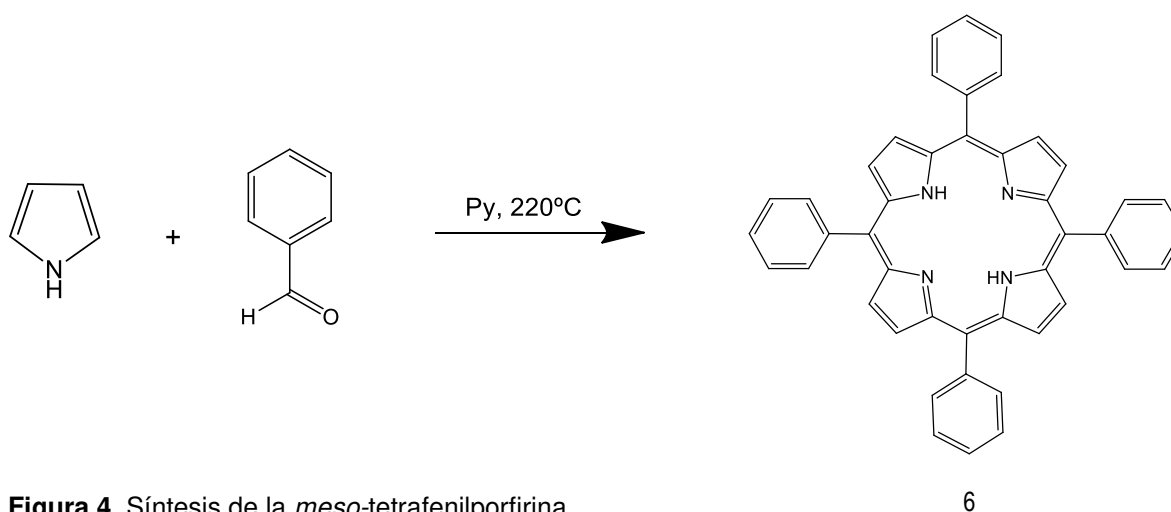


Figura 4. Síntesis de la *meso*-tetrafenilporfirina.

Años más tarde, Adler y colaboradores sintetizaron la *meso*-tetrafenilporfirina, así como sus derivados de complejos metálicos, utilizando diferentes disolventes (metanol, ácidos orgánicos, acetona y benceno acidulados) a temperaturas de ebullición y presión atmosférica (22). Los resultados de estos experimentos y sus estudios mecanísticos condujeron al desarrollo de un nuevo método de síntesis de la *meso*-tetrafenilporfirina en el que se utilizó ácido propiónico como medio de reacción (**Figura 5**, #6). Se determinó que tanto el rendimiento como la velocidad de condensación dependen de la acidez, el disolvente utilizado, la temperatura, la disponibilidad de oxígeno atmosférico y la concentración de los reactivos (23). Este método de síntesis suele dar rendimientos entre el 10 y 30% al utilizar ácido acético o ácido propiónico (21).

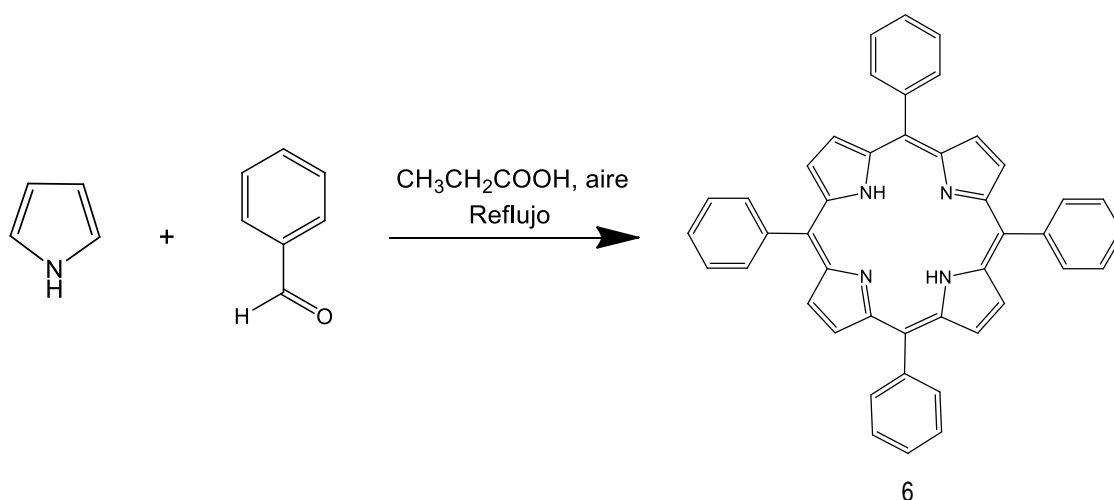


Figura 5. Síntesis de la *meso*-tetrafenilporfirina utilizando el método de Adler.

Por otro lado, es común que se presenten algunos problemas intrínsecos a la metodología. Uno de ellos es el fracaso de la reacción debido a las drásticas condiciones de reacción, al utilizar benzaldehídos con grupos funcionales sensibles. El segundo se debe a la alta obtención de productos de polimerización, los cuales pueden dificultar considerablemente la purificación. Por último, la reproducibilidad de la reacción suele ser muy baja (24).

Lindsey desarrolló una nueva metodología derivada del método de Adler en la cual se alcanzan mayores rendimientos y las reacciones se llevan a cabo en condiciones de reacción muy suaves. El proceso consta de dos pasos; primero se condensan el pirrol y el arilaldehído para formar el respectivo porfirinógeno (#7) y finalmente éste es oxidado para formar la porfirina (#8) (**Figura 6**). El pirrol y el arilaldehído reaccionan a temperatura ambiente en CH_2Cl_2 con flujo de N_2 y pequeñas cantidades de catalizador ácido. Estos últimos pueden ser $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ o TFA. Finalmente se agrega DDQ o *p*-cloranilo para efectuar la oxidación (25, 26).

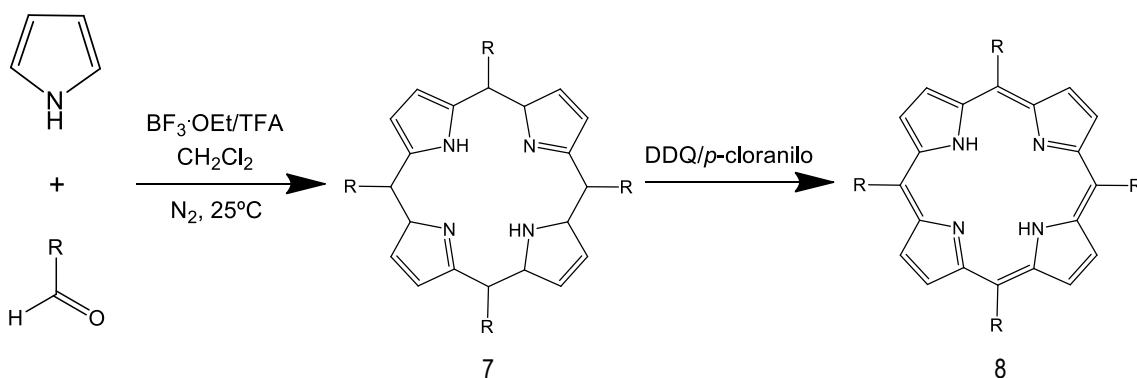


Figura 6. Método de Lindsey.

La formación del porfirinógeno ocurre gracias a la existencia de equilibrio termodinámico, el cual permite que el tetraarilporfirinógeno cíclico predomine sobre el polipirrilmetano lineal. Este método permite obtener porfirinas de una forma más limpia y mayores rendimientos, los cuales oscilan del 10 al 60% (21). El éxito en la obtención de mayores rendimientos radica en la elección adecuada de las condiciones de reacción. Por ejemplo, se ha visto que al utilizar concentraciones de pirrol y benzaldehído de 10^{-2} M se obtiene un rendimiento del 46% (26).

MacDonald desarrolló un método de síntesis en el cual lograron condensar en medios ácidos 5,5'-diformilpirrometanos con dipirrilmetanos, ya sea sin sustitución o con ella (grupo carboxilo), en las posiciones 5, 5' (**Figura 7**) (27). Esta metodología suele dar rendimientos del 10 al 20% (21). Por esa época, Woodward

y colaboradores llevaron a cabo la síntesis total de la clorofila utilizando una metodología similar, pero desarrollada independientemente (28).

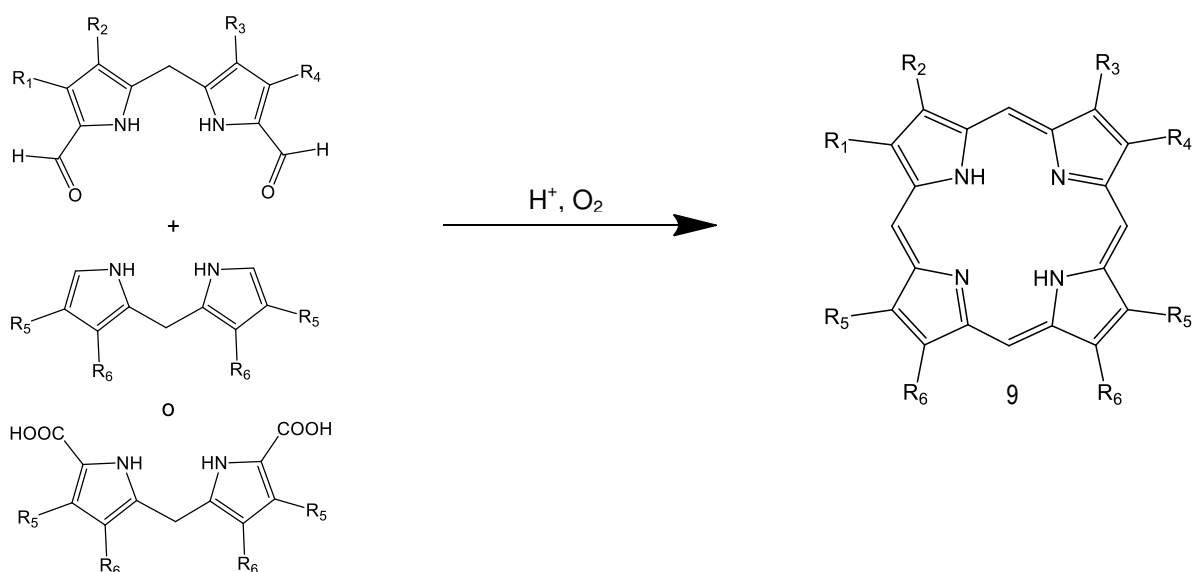


Figura 7. Síntesis MacDonald [2+2].

Como puede verse, esta metodología parte de precursores dipirrólicos los cuales pueden ser sintetizados de manera relativamente fácil. Los dipirrilmetanos pueden ser clasificados en simétricos (a) o asimétricos (b) en función de las sustituciones que presenten en la posición 5 del pirrol (**Figura 8**).



Figura 8. Estructura de dipirrilmetanos. a) simétrico y b) asimétrico

Estas estructuras pueden estar sustituidas o no en la posición *meso*. La síntesis habitual para la obtención del dipirrilmetano (#10) es la reducción de Huang Minlon (**Figura 9**), con rendimientos del 60 al 70%. La di-2-pirrolil-cetona puede obtenerse reaccionando pirrol con EtMgBr y fosgeno (29).

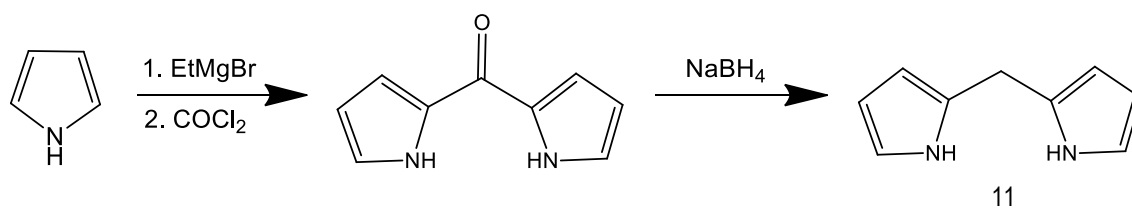


Figura 9. Síntesis habitual de dipirrilmetano.

Los dipirrilmetanos pueden obtenerse en un solo paso mediante la condensación de pirrol con aldehído en catálisis ácida (**Figura 10**). Por ejemplo, el 5-fenildipirrilmetano puede sintetizarse condensando benzaldehído con pirrol en exceso, en atmósfera inerte, utilizando TFA como catalizador. La reacción transcurre en tan sólo 15 minutos, sin embargo, el aislamiento del compuesto de interés suele ser laborioso (30). Sobral y colaboradores desarrollaron una metodología en la que es posible obtener dipirrilmetanos en agua. Para ello se realiza la condensación de pirrol con aldehído o cetona y se utiliza ácido clorhídrico como catalizador. Esta metodología permite obtener rendimientos que oscilan en un rango del 37 al 90%, así como un aislamiento más sencillo y alta pureza (31).

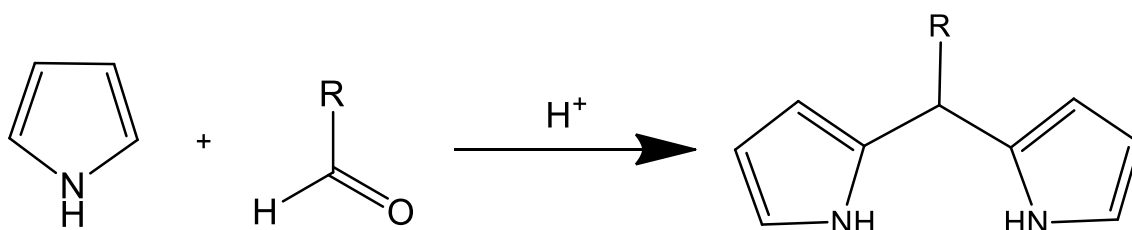
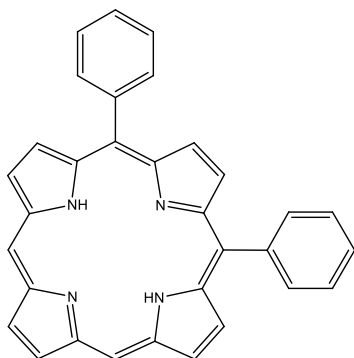


Figura 10. Síntesis de dipirrilmetanos empleando catálisis ácida.

Las condensaciones 2+2 no sólo permiten la síntesis de porfirinas con los cuatro sustituyentes *meso* iguales, sino sistemas asimétricos del tipo *cis*-A₂B₂-porfirina (a) o *trans*-A₂B₂-porfirina (b) (**Figura 11**) (32, 33).

a) 5,10-difenilporfirina
(*cis*-A₂B₂-porfirina)



b) 5,15-difenilporfirina
(*trans*-A₂B₂-porfirina)

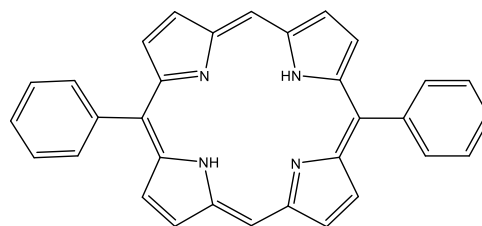


Figura 11. Porphirinas asimétricas obtenidas por condensación 2+2.

Existen diversos métodos para sintetizar metaloporfirinas ampliamente reportados y con buenos resultados:

A. Método Cloroformo/Metanol (1, 2)

Este método utiliza soluciones saturadas de acetato metálico diluidas en cloroformo o metanol con la porfirina a temperaturas de ebullición. Ha sido utilizado para la inserción de cationes metálicos divalentes como Zn, Co, Cu y Ni.

B. Método Ácido Acético/Acetato (1, 2)

En este método la sal metálica, usualmente en forma de acetato, y la porfirina son calentados a 100°C en ácido acético. Este método también es útil para la inserción de cationes metálicos divalente como Mn, Ag, Cu y Fe.

C. Método de DMF (1, 2)

Esta metodología se lleva a cabo disolviendo la sal metálica (cloruros metálicos) y la porfirina en DMF, manteniendo la reacción a temperatura de ebullición por varias horas. La DMF es un disolvente muy bueno para disolver tanto porfirinas como muchas sales metálicas, por lo que su uso se vuelve versátil. Se han visto buenos resultados en la inserción de algunos cationes metálicos como Co, Mn, V, Cd, Sn y Ag.

D. Método de piridina (1, 2)

Es una excelente alternativa para los casos en los que las porfirinas sean lábiles en las condiciones que proporciona el ácido acético. Se aprovecha la propiedad de buena solubilidad que posee la piridina hacia distintas porfirinas y sales metálicas. La porfirina y la sal metálica son disueltas en piridina y la reacción se mantiene a temperatura de ebullición por varias horas. Este método ha sido ampliamente utilizado para introducir magnesio, sin embargo, también ha mostrado buenos resultados para introducir algunos cationes como Ca, Sr, Ba, Zn y Si.

E. Método del carbonilo metálico (1, 2)

La porfirina es calentada a ebullición con carbonilo metálico en disolventes inertes como benceno, tolueno o decalina. Se lleva a cabo un proceso óxido reducción en el que los protones de los pirroles son reducidos y el metal oxidado, resultando en la inserción de este último en el macrociclo porfirínico. Algunos metales que se han insertado son Cr, Mo, Mn, Tc, Fe y Ru.

F. Método de acetilacetato (1, 2)

En este método la porfirina y el acetilacetato son disueltos en el disolvente orgánico y la reacción es mantenida a temperaturas de 180-240°C por varias horas. Los disolventes más usuales son el benceno, fenol o clorobenceno. Esta metodología ha sido utilizada para insertar metales de los grupos IIIA y IIIB, aunque también se han logrado insertar metales como Mn, Fe, Co y Cu.

2.3. Cáncer

El cáncer es una enfermedad genética que conduce a la proliferación incontrolable de las células, produciendo masas anormales de tejido denominadas tumores o neoplasias malignas. Se dice que es una enfermedad genética porque su origen puede encontrarse en alteraciones de genes específicos (34). Las células cancerígenas pueden ignorar distintas señales que poseen las células normales, por ejemplo, aquellas encargadas de detener la división celular o de iniciar la apoptosis. Esta última es una vía de destrucción y eliminación de células dañadas. Estas células también son capaces de evadir la respuesta del sistema inmune encargada de eliminar células anormales o dañadas (35).

Cuando las células cancerígenas se diseminan desde el tumor primario, a través de la sangre o el sistema linfático, a otras partes del cuerpo, pueden invadir y destruir tejido sano, formando cáncer secundario, también conocido como metástasis. Este estadio de la enfermedad es muy difícil de tratar (36).

2.3.1. Etiología del cáncer

El cáncer es causado frecuentemente por cambios en genes encargados del crecimiento y división celular. Estos cambios genéticos ocurren principalmente en tres tipos de genes (37-39):

1. Protooncogenes

Estos genes están involucrados en la regulación del crecimiento y división celular, sin embargo, cuando sufren alguna alteración pueden provocar que las células se dividan sin control y no mueran cuando sea necesario.

2. Genes supresores de tumores.

Estos genes también controlan el crecimiento y división celular. Cuando ocurren alteraciones en ellos las células pueden dividirse sin control alguno.

3. Genes reparadores del ADN.

Estos genes tienen como función la reparación del ADN dañado. Cuando éstos están alterados, las células con mutaciones pueden producir más mutaciones en otros genes.

Actualmente se tienen bien identificados distintos factores causantes de cáncer y son clasificados en dos grupos: factores internos y factores adquiridos o ambientales (40). Dentro de los factores adquiridos o externos se encuentran el alcohol (41, 42), el tabaco (43, 44), la obesidad (45, 46), la dieta (47, 48), radiaciones (49, 50) o agentes infecciosos como el virus del VIH (51), el VPH (52) o el VHB (53). Estos factores son la causa del 90-95% de los cánceres conocidos. Los factores internos son la causa del 5-10% de los cánceres restantes y dentro de ellos podemos encontrar mutaciones hereditarias (54), hormonas (55) y condiciones inmunes (56).

2.3.2. Cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino es el segundo tipo de cáncer más común entre las mujeres a nivel mundial (57). Es causado principalmente por una infección persistente asociada a tipos de VPH de alto riesgo y otros factores. Algunos de estos factores incluyen fumar, tener un sistema inmune debilitado, dar a luz en edad joven, múltiples embarazos, uso prolongado de anticonceptivos y la presencia de otras enfermedades de transmisión sexual. Fumar incrementa el riesgo de desencadenar muchos tipos de cánceres, entre ellos el cervicouterino. Las mujeres que dan a luz antes de los 18 años son significativamente más proclives a desarrollar cáncer cervicouterino, así como aquellas que han tenido al menos tres embarazos. También se han encontrado asociaciones entre el aumento en el riesgo de desarrollar este cáncer y el uso prolongado de anticonceptivos orales, así como la presencia de algunos agentes etiológicos de enfermedades de transmisión sexual como el VIH, clamidia o virus herpes simple tipo 2 (58-60).

La infección por VPH se lleva a cabo por transmisión sexual y el 80% de hombres y mujeres a nivel mundial la llegan a padecer a lo largo de su vida sexual. Una vez adquirida, la mayoría de las mujeres elimina la infección de su organismo en un periodo de 18 a 24 meses, sin embargo, esta persiste en 3-5% de los casos, desarrollando tejido preinvasivo. Menos del 1% de estos últimos casos progresa a cáncer (60, 61).

Existen más de 100 tipos diferentes de VPH, de los cuales, entre 30 y 40 pueden infectar el tracto genital humano. Estos virus infectivos se dividen en tipos de alto riesgo (oncogénicos) y tipos de bajo riesgo (no oncogénicos). Dentro de los tipos de alto riesgo se encuentran las cepas 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52 y 58, los cuales son responsables de cánceres cervicales, vulvares, vaginales y anales. Dentro de los tipos de bajo riesgo se encuentran las cepas 6, 11, 40, 42, 43, 44 y 54, las cuales son responsables de la formación de verrugas genitales (62). Las cepas 18 y 16 son responsables del 70% de los casos de cáncer cervicouterino, siendo esta última la más oncogénica y causa de casi el 50% de los casos (63, 64).

Este cáncer presenta distintos grados en función de su gravedad y pueden ser definidos por el sistema de clasificación FIGO (65, 66):

- Estadio I: carcinoma cervical limitado al útero.
- Estadio II: el tumor invade más allá del útero pero no a la pared pélvica ni al tercio inferior de la vagina.
- Estadio III: el tumor se extiende hasta la pared pélvica e involucra el tercio inferior de la vagina y provoca hidronefrosis o disfunción del riñón.
- Estadio IVA: el tumor invade la mucosa de la vejiga o recto y/o se extiende más allá de la pelvis.
- Estadio IVB: metástasis a órganos distantes.

2.3.3. Tratamientos

Los principales tratamientos del cáncer cervicouterino son la cirugía y la radiación, sin embargo, estos serán elegidos en función del estadio de la enfermedad. Otra modalidad de tratamiento también utilizada es la quimioterapia. Esta es utilizada en estadios avanzados en combinación con cirugía y radiación. También se utiliza, aunque menos frecuente, inmunoterapia como tratamiento adyuvante en cirugía, radiación y quimioterapia (66). Los principales quimioterapéuticos utilizados son el cisplatino (67) o el cisplatino más 5-fluorouracilo (68) y bevacizumab como inmunoterapéutico (69).

Se han desarrollado modalidades terapéuticas alternativas como la terapia viral oncolítica y la terapia fotodinámica. Esta última ha mostrado potencial terapéutico en el tratamiento de lesiones premalignas como la neoplasia intraepitelial cervical, el carcinoma *in situ* y el cáncer invasivo de cuello uterino en etapa temprana (11).

2.4. Terapia fotodinámica (TFD)

La TFD es utilizada para tratar afecciones tanto oncológicas como no oncológicas (70). Algunas de las patologías oncológicas son el cáncer de piel de tipo melanoma, cáncer de pulmón, cáncer cervicouterino (71) e incluso cánceres más profundos como glioblastoma multiforme primario (72). La TFD es una técnica poco invasiva que posee actividad citotóxica dirigida principalmente a células malignas. El procedimiento requiere la administración de un fotosensibilizador, seguido por la incidencia de radiación a una longitud de onda característica en la zona afectada. Lo anterior desencadena una reacción fotoquímica que genera EROs, lo cual causa la muerte celular por la vía de la apoptosis o la necrosis. Lo esperado es que no ocurra esta última vía ya que provocaría la liberación del contenido intracelular, incluyendo enzimas, dañando los componentes celulares o células completas vecinas. Entendemos por fotosensibilizador al compuesto químico que es capaz de absorber radiación electromagnética e iniciar una reacción fotoquímica o fotofísica. La mayoría de los fotosensibilizadores utilizados

en esta terapia son anillos tetrapirrólicos derivados de la protoporfirina. Estos compuestos deben presentar su banda de absorción de interés (banda Q) entre 600 y 800 nm, ya que si el rango es excedido, la radiación absorbida no proporcionará la energía suficiente para producir especies reactivas de oxígeno (12), además, también se presenta una mayor penetración de la luz a través del tejido en este intervalo (73).

Los fotosensibilizadores y la luz se habían utilizado durante mucho tiempo con fines terapéuticos, sin embargo, Lipson y Baldes sentaron los cimientos para el desarrollo de la TFD con sus estudios sobre el uso de derivado de hematoporfirina como biomarcador en la detección con radiación ultravioleta de tejidos neoplásicos (74).

2.4.1. Mecanismo de fototoxicidad

Una vez que los fotosensibilizadores absorben luz, éstos pasan de un estado electrónico basal a un estado electrónico excitado (singulete). Cuando regresan a su estado basal emiten fluorescencia. Otro escenario es que éstos pasen a un estado triplete e interaccionen con las moléculas circundantes, lo que puede originar dos tipos de reacciones fotooxidativas (75):

- Reacción tipo I; genera EROs (O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot), los cuales inician reacciones en cadena de radicales libres.
- Reacción tipo II; ocurre transferencia de energía, lo cual provoca la formación de 1O_2 .

El mayor daño es causado por el 1O_2 . Este, al ser una molécula muy reactiva, reacciona de forma rápida con muchas biomoléculas, principalmente con las membranas celulares. Los componentes más susceptibles de ser afectados son los lípidos insaturados, el colesterol y algunos aminoácidos.

Se ha observado en cultivos celulares que, una vez que las porfirinas entran en contacto con la membrana plasmática, estas son internalizadas en las células por dos mecanismos. Pueden entrar por difusión pasiva (derivados hematoporfirínicos, hidroxietildeuteroporfirina, ftalocianina de zinc, monoácidos derivados de la benzoporfirina) o endocitosis (N-monoaspartil clorina e6, lisil clorina p6, ftalocianinas sulfonadas de aluminio). La localización preferencial del fotosensibilizador es crítica ya que determinará en gran medida tanto la eficiencia de la actividad fotodinámica como el tipo de muerte celular que inducirá (76).

Por otro lado, estudios recientes han demostrado que en las células cancerosas existe una sobreexpresión del transportador ABCG2 dependiente de ATP, el cual es una bomba que genera resistencia a múltiples fármacos y posee la capacidad de efluir a distintos agentes fotosensibilizantes utilizados preclínicamente y clínicamente, como es el caso de algunas porfirinas y clorinas. Esto podría explicar la resistencia que presentan algunos individuos a la TFD para el cáncer (77).

2.4.2. Citotoxicidad selectiva

En la actualidad se desconoce el mecanismo preciso por el cual las porfirinas se concentran mayoritariamente en los tejidos cancerígenos, sin embargo, se han encontrado algunos procesos involucrados. Uno de ellos es atribuido a los receptores de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Esta molécula es una de las encargadas de distribuir a través del organismo a las porfirinas. Se ha visto que las células que poseen una sobreexpresión de estos receptores tienden a contener mayores concentraciones de porfirinas respecto a las células sanas (6). Otro mecanismo sugiere una correlación entre determinados fotosensibilizadores y las lipoproteínas de alta densidad (HDL). También se ha visto que las células tumorales que tienen un pH inferior al de las células sanas retienen mejor a estos fármacos (78).

2.4.3. Evolución de los fotosensibilizadores

Fotosensibilizadores de primera generación

El primer fotosensibilizador empleado en la TFD para el cáncer fue el porfímero sódico, el cual fue conocido después por su nombre comercial Photofrin (12). Este compuesto es un derivado de la hematoporfirina y representa a la primera generación de fotosensibilizadores. Consiste de una mezcla de monómeros, dímeros y oligómeros de porfirina y está disponible en el mundo entero. Inicialmente, en su proceso de obtención, se aisló la hematoporfirina de sangre seca. Posteriormente se obtuvo un derivado porfirínico mediante acetilación, reducción y purificación parcial. Este derivado mostró un efecto fototóxico doce veces mayor que la hematoporfirina aislada. Una última purificación llevó a los investigadores a obtener el porfímero sódico.

A pesar de que el porfímero sódico no produce $^1\text{O}_2$ con gran rapidez, dado que el tiempo de exposición por lesión es de 10 a 20 minutos, produce una ablación efectiva del tumor. Por otra parte, este fármaco posee la desventaja de retenerse en todos los tejidos hasta 6 semanas, dejando al paciente expuesto a quemaduras solares de la piel debido a una reacción de fotosensibilidad no intencionada. Otro gran inconveniente es su compleja composición. Además de los componentes antes mencionados, también lo constituyen otros que no producen fotoactividad (79-81).

Fotosensibilizadores de segunda generación

La mayor parte de los fotosensibilizadores de segunda generación siguen conservando la estructura tetrapirrólica típica de las porfirinas, sin embargo, los investigadores han llevado a cabo modificaciones estructurales alterando la periferia de las porfirinas o introduciendo átomos metálicos en su centro. Por ejemplo, se han sintetizado diamino porfirinas con la actividad citotóxica que confiere el platino más la actividad fotodinámica. También se han sintetizado derivados de porfirina llamados ftalocianinas, cuya composición consta de cuatro unidades de isoindol unidas a través de cuatro átomos de nitrógeno, o bien,

reduciendo una o más de las unidades de pirrol que conforman el macrocilo, obteniendo clorinas. Estas modificaciones químicas se traducen en un desplazamiento de la banda Q en un intervalo de 650 a 700 nm. La estructura base de las ftalocianinas es insoluble en agua, lo cual imposibilita su disolución en los fluidos corporales. Esto provoca una baja producción de oxígeno singulete. Sin embargo, se han sintetizado ftalocianinas con distintos átomos metálicos en su centro (zinc, aluminio o silicio) o con diversos sustituyentes, tanto en sus puentes metino como en sus sitios β pirrólicos (**Figura 12**). Estos derivados novedosos tienen cambios en su solubilidad debidos a las diferentes polaridades y cargas que exhiben, así como cambios en sus actividades biológicas. De igual forma, se han intentado obtener derivados de la clorina, tanto quelando átomos metálicos en su centro, como añadiendo sustituyentes en la periferia (79, 82).

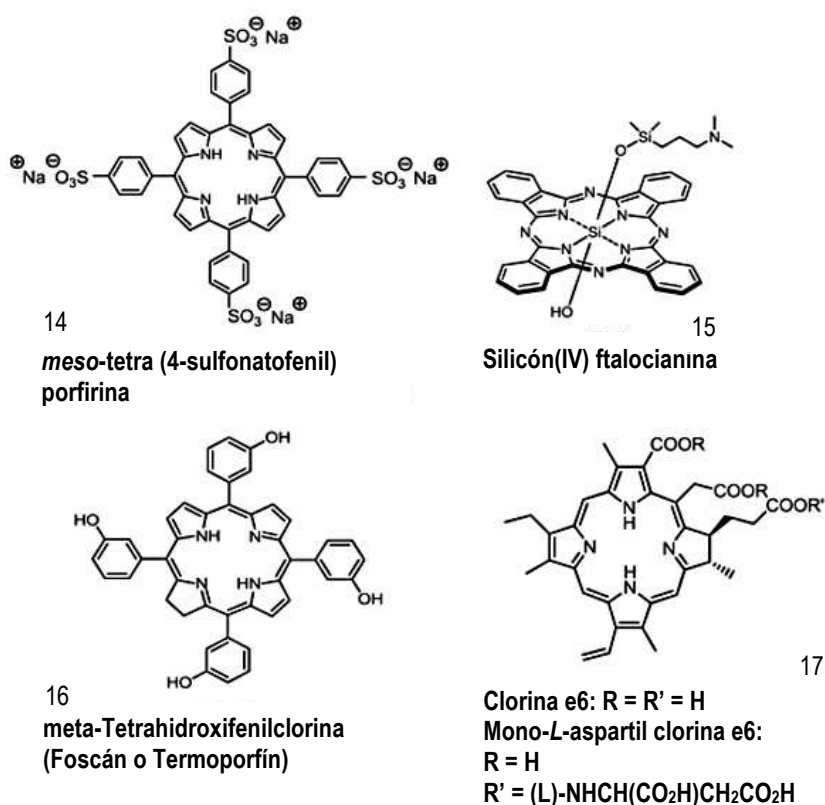


Figura 12. Derivados de ftalocianinas y clorinas. Tomada de Fong *et al.* 79.

Fotosensibilizadores de tercera generación

A pesar de las mejoras que se logran con los agentes fotosensibilizadores de segunda generación, la mayoría de ellos no poseen una alta selectividad para las células cancerígenas. Esto ha llevado a la búsqueda de moléculas con esta propiedad. Para poder alcanzarlo se parte de tres enfoques distintos. El primero de ellos considera que existen diferencias fisiológicas entre una célula normal y una cancerígena. Por ejemplo, se han buscado antígenos o receptores sobreexpresados en la membrana plasmática de las células malignas para formar conjugados fotosensibilizador-anticuerpo y así poder dirigirlos hacia estas células. El segundo aprovecha el microambiente de las células tumorales para diseñar moléculas que sólo produzcan la fotoactividad cuando entren en contacto con éste, es decir, que se comporten como un profármaco. El tercero busca la encapsulación de los fotosensibilizadores en acarreadores coloidales, por ejemplo, liposomas, micelas poliméricas y distintas clases de nanopartículas. Estas nanoestructuras poseen por lo general buena acumulación y mayor retención en el tejido tumoral (79).

3. Antecedentes

Un fotosensibilizador ideal debe poseer distintas características que le permitan proporcionar el mayor efecto terapéutico posible y producir el menor número de efectos adversos. Para poder alcanzar esto debe ser un compuesto puro, con una banda Q que le permita mejor absorción a través del tejido en cuestión, con buena solubilidad en los fluidos acuosos, además de poseer alta selectividad por las células cancerígenas (79). Para esto se han sintetizado fotosensibilizadores conjugados, en donde al fotosensibilizador se le une un ligando específico a una diana biológica, por ejemplo, a un anticuerpo monoclonal, con el fin de dirigirlo selectivamente (83). También se han unido ciertos agentes quimioterapéuticos al anillo porfirínico para aumentar la eficacia de la TFD (84).

Ravindra y colaboradores conjugaron pirofeoforbida-A y purpurimida con distintos carbohidratos. Descubrieron que algunos conjugados resultaron ser más eficaces que las moléculas parentales, además, en las purpurinimidias, la posición del residuo de carbohidrato mostró una diferencia considerable en la eficacia de la TFD (84).

Por otro lado, un grupo de investigadores sintetizó una Tetra(hidroxifenil)porfirina y su derivado metálico de zinc. Para determinar la actividad fotodinámica *in vitro* se realizó el ensayo de MTT en tres líneas celulares de cáncer diferentes; IMR 32, MCF-7 y MDA-MB-231. Los resultados mostraron que las moléculas poseían una actividad fotodinámica superior al fotosensibilizador Photofrin (85).

Chaleix y colaboradores sintetizaron una nueva clase de porfirinas, dos series de porfirinas unidas al tripéptido RGD y dos mono-RGD-triglucosilporfirinas. Los estudios de citotoxicidad de los conjugados RGD-porfirinas fueron evaluados contra la línea celular K-562 y se comparó con el Photofrin. Una de ellas mostró una actividad muy similar a éste último. Se obtuvieron resultados similares con las mono-RGD-triglucosilporfirinas (86).

Nwogu y colaboradores compararon la actividad citotóxica de la nueva molécula 3-(1'-*m*-yodobenziloxi)etil-3-devinilpirofeoforbida-a, un derivado de la clorofila A, contra la actividad del porfímero sódico, ambos en xenoinjertos de cáncer de pulmón en ratones. La nueva molécula mostró mayor eficacia (87).

Un grupo de investigadores llevaron a cabo la síntesis y evaluación biológica *in vitro* en células HeLa de las porfirinas tricloruro de 5-(4-octadecanoamidofenil)-10,15,20-tris(N-metilpiridin-3-il)porfirina (molécula anfifílica) y tricloruro de 5-(4-acetamidofenil)-10,15,20-tris(N-metilpiridin-3-il)porfirina (molécula hidrofílica). Al irradiar las células tratadas con ambos compuestos por 15 y 20 minutos, los valores de las IC₅₀ para la porfirina hidrofílica fueron 37 y 6 veces más grandes, respectivamente, que las IC₅₀ de la porfirina anfifílica. Este estudio demuestra la importancia que juega el balance hidrofílico-lipofílico en los fotosensibilizadores para mejorar la actividad citotóxica (88).

Dos fotosensibilizadores fueron probados de manera simultánea en las líneas celulares HeLa, HaCat y MCF-7, para demostrar la existencia de sinergismo. Las moléculas fueron la Zn(II)-ftalocianina y la *meso*-tetrakis(4-N-metilpiridil)porfirina. Los resultados mostraron que ambos fotosensibilizadores ejercieron un efecto fototóxico altamente significativo al combinarse que por separado. Esto sucedió en las tres líneas celulares. Otro hallazgo interesante fue la influencia que tuvieron las irradiancias utilizadas en la vía de muerte celular causada. Esta última cambió de apoptosis a necrosis al utilizar dosis de luz de 2.4 y 3.6 J/cm², respectivamente (89).

4. Hipótesis

El método de síntesis Adler-Longo permite sintetizar porfirinas simétricas efectivas contra la línea celular cancerígena HeLa (cáncer cervicouterino), partiendo de pirrol y aldehídos sustituidos con diferentes grupos funcionales.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Sintetizar porfirinas simétricas a partir de pirrol y probar su actividad citotóxica.

5.2. Objetivos particulares

1. Preparar las porfirinas simétricas con pirrol y benzaldehído, *p*-fluorobenzaldehído, *p*-clorobenzaldehído, *p*-bromobenzaldehído y *p*-hidroxibenzaldehído”.
2. Caracterizar la estructura de las porfirinas simétricas mediante espectrometría UV-Visible, infrarrojo, espectrometría de masas y espectroscopía de resonancia magnética nuclear.
3. Evaluar la actividad citotóxica de las porfirinas simétricas en la línea celular de cáncer cervicouterino (HeLa).

6. Metodología

6.1. Reactivos

El pirrol (Sigma-Aldrich) y el benzaldehído (Sigma-Aldrich) fueron utilizados sin purificación previa. El 4-hidroxibenzaldehído se obtuvo de la casa comercial Aldrich y el acetato de zinc de Mallinckrodt.

Como soporte para la cromatografía en columna se utilizó sílica gel (J.T. Baker)

6.2. Síntesis de porfirinas

Las porfirinas fueron sintetizadas utilizando la metodología Adler-Longo(23). Inicialmente se añadieron 0.028 mol de arilaldehído a 140 mL de ácido propiónico y se calentó a ebullición. Una vez alcanzada esta temperatura, se añadieron 0.028 mol de pirrol en intervalos de 10 minutos (200 μ L/10 min). La mezcla de reacción se mantuvo en ebullición por un periodo de 3 horas y media. Posteriormente se dejó en refrigeración toda la noche para precipitar a las porfirinas. Finalmente se llevó a cabo la filtración y los sólidos obtenidos fueron lavados exhaustivamente con metanol para obtener cristales de color violeta. Este último paso fue diferente para la OHTFP; el sólido obtenido se colocó en un Soxhlet y la porfirina se extrajo con acetato de etilo. Para finalizar, se evaporó el disolvente y los sólidos obtenidos se trituraron y lavaron con cloroformo para dar cristales color azul oscuro.

Para la síntesis de Zn-OHTFP se agregaron 1.46×10^{-4} mol de OHTFP y 1.46×10^{-3} mol de acetato de zinc en 80 mL de metanol. La mezcla de reacción se mantuvo en ebullición por cinco horas y se evaporó el disolvente. El producto fue aislado por cromatografía en columna con hexano/acetato de etilo y, finalmente, éste se lavó tres veces con cloroformo para obtener cristales azul metálicos.

6.3. Caracterización de las porfirinas sintetizadas

Los espectros de $^1\text{HRMN}$ fueron obtenidos en un espectrómetro Agilent DD2 600. Se utilizaron CDCl_3 y DMSO-d_6 como disolventes y TMS como referencia a 0.

Los espectros de espectrofotometría UV-Visible se obtuvieron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 en solución de CHCl_3 o MeOH, según el caso.

6.4. Construcción del sistema de iluminación

Para la construcción del sistema de iluminación se utilizó una tira de 300 luces LED (Stereon) con las siguientes especificaciones:

- Alimentación: 12 V
- Color: rojo
- $\lambda \approx 650 \text{ nm}$

Las tiras fueron cortadas y adheridas en una tabla de madera con dimensiones de 12X20 cm. Cada tira fue conectada en serie. Se colocaron bases a la tabla con las tiras de tal manera que hubiera una distancia de 10 cm entre la placa de 96 pozos y las luces LED.

6.5. Estudios de citotoxicidad intrínseca y fototoxicidad *in vitro*

Para evaluar la actividad biológica de estos compuestos como agentes fotosensibilizantes se siguió el procedimiento reportado por Hopkins y colaboradores (90). Se empleó la línea celular HeLa. Las células se mantuvieron en medio DMEM (Caisson Laboratories) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Corning) y 100 μL de penicilina y estreptomina (Sigma-Aldrich), a una temperatura de 37°C y 5% de CO_2 . Las células fueron cultivadas en frascos para

cultivo celular, lavadas cada tercer día con PBS, despegadas con solución de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) al 10% y transferidas a cajas de 96 pozos. Se utilizó una cámara de Neubauer para realizar el conteo celular. Se sembraron 5×10^3 células por pozo en cajas de 96 pozos y se incubaron por 24 horas. Posteriormente, la TFP, FTFP, CITFP y BrTFP se mezclaron con polivinilpirrolidona (relación 1:4), se suspendieron en PBS y se llevaron a cabo diluciones seriadas. Las OHTFP y Zn-OHTFP se disolvieron en DMSO (J.T. Baker), se diluyeron y se realizaron diluciones seriadas. La cantidad de DMSO por pozo fue de 0.1%. Se aplicaron los tratamientos a distintas concentraciones. Después de 24 horas de incubación, el medio fue eliminado, las células de cada pozo se lavaron con 100 μ L de PBS y posteriormente se adicionaron 100 μ L de DMEM por pozo. Las células fueron irradiadas con luz roja a una irradiancia de 3.75 J/m² por 15, 30 y 60 minutos y se incubaron por 24 horas más.

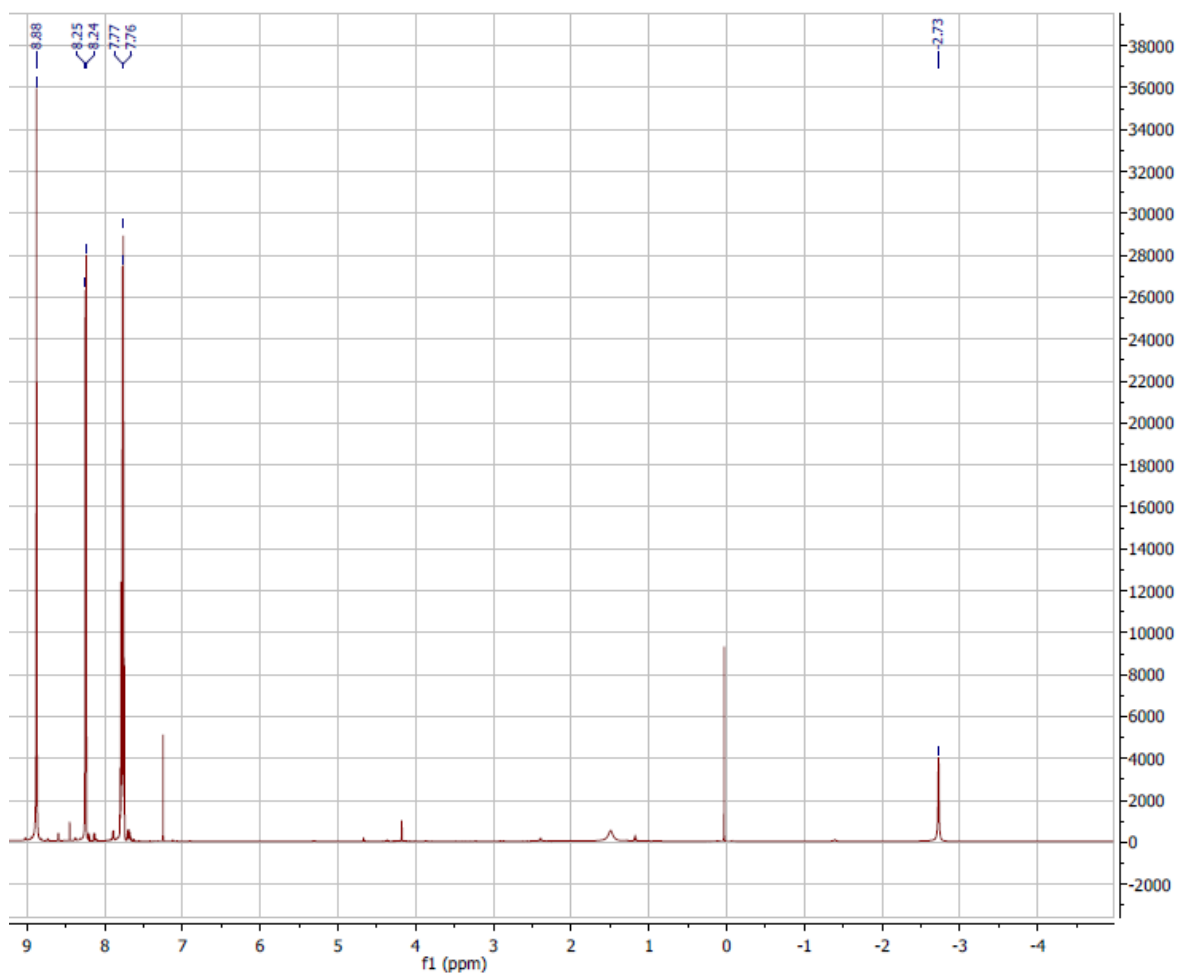
Se utilizó el ensayo MTT para determinar la proliferación celular. Se añadieron 10 μ L de MTT (5 mg/mL) por pozo y se dejó incubar por 4 horas a 37°C. Pasado este tiempo, el sobrenadante fue eliminado, se agregaron 100 μ L de DMSO a cada pozo y las placas se mantuvieron en agitación hasta que los cristales de formazán fueron disueltos. Finalmente se midieron las absorbancias en un lector de microplacas (iMark™ Microplate Absorbance Reader) a una longitud de onda de 540 nm. Para determinar la citotoxicidad intrínseca de los compuestos se utilizó la misma metodología, con excepción de la exposición a la radiación.

7. Resultados

7.1. Elucidación estructural de las porfirinas sintetizadas mediante $^1\text{HRMN}$ y espectrofotometría UV-Visible

El porcentaje de rendimiento obtenido de la TFP fue de 31.4% y los espectros de $^1\text{HRMN}$ (**Figura 13**) y UV-Visible (**Figura 14**) mostraron las siguientes señales: $^1\text{HRMN}$ (CDCl_3 : ppm, 600 MHz) 8.88 (s, 8H), 8.25-8.24 (d, 8H, $J = 8.25$ Hz), 7.77 (m, 12H, $J = 8.25$ Hz), -2.73 (s, 2H); UV-Vis (CHCl_3 : nm, absorbancia): λ 515 (3.025), 550 (1.294), 591 (0.925), 647 (0.740).

A.



B.

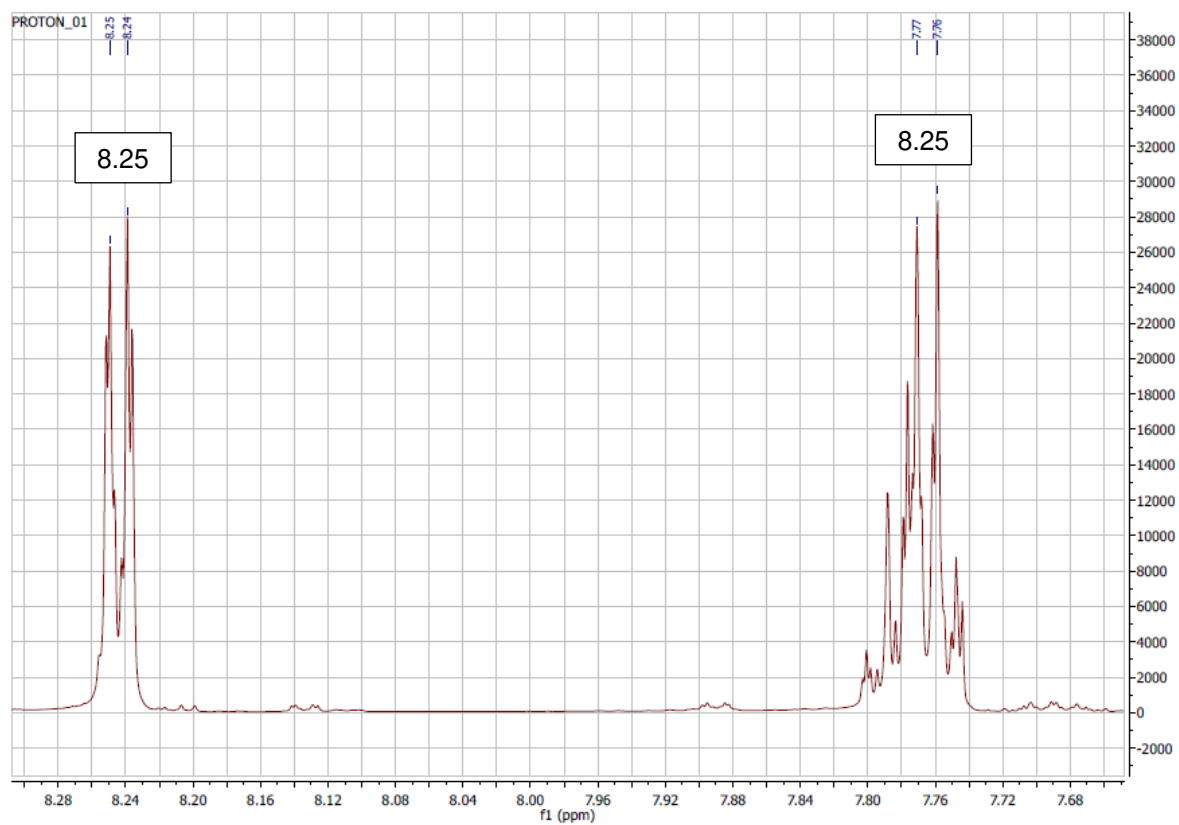


Figura 13. Espectro de ^1H RMN para la TFP a 600 MHz en CDCl_3 . A. Se muestran todas las señales de interés. B. Esta expansión muestra la presencia de un doble y un múltiple con su respectiva constante de acoplamiento.

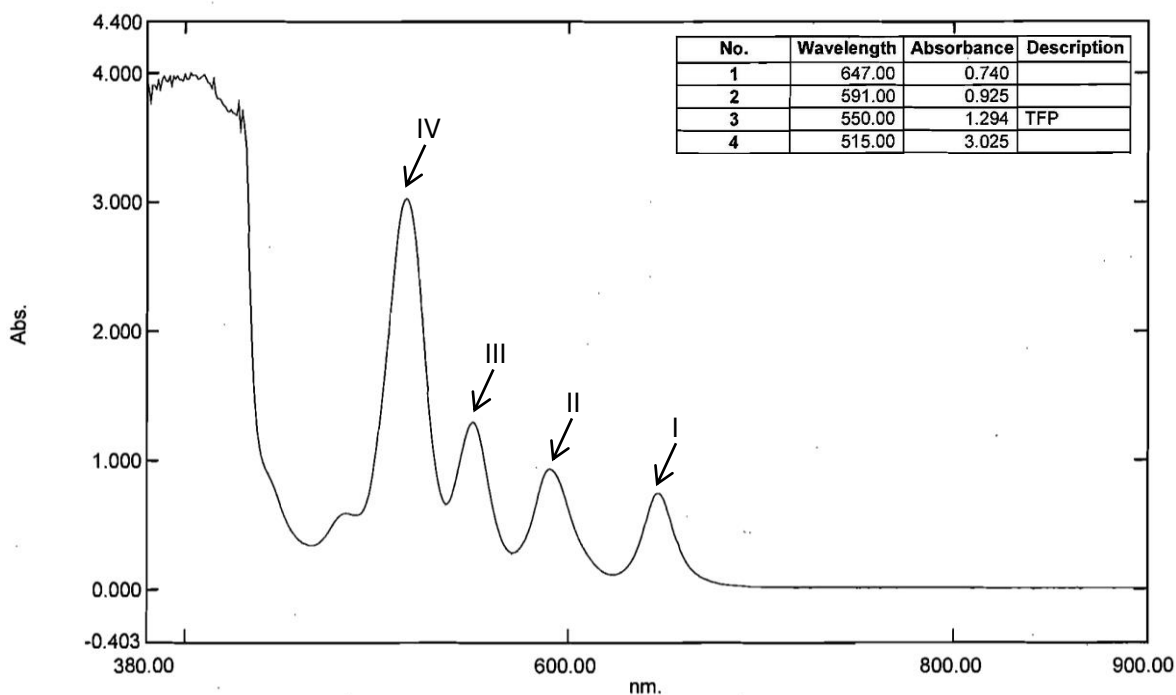
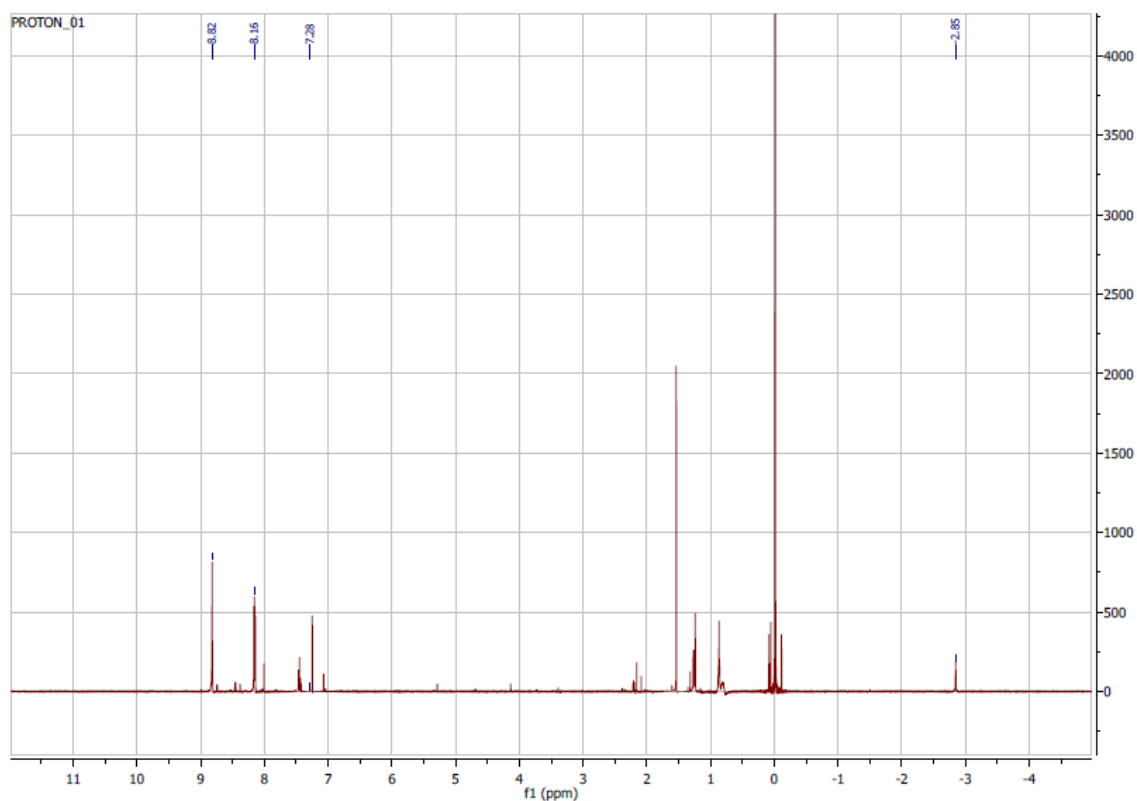


Figura 14. Espectro de absorción UV-Visible de la TFP en CHCl_3 a una concentración de 0.1 mg/mL.

El resto de los espectros de absorción UV-Visible pertenecientes a FTFP, CITFP, BrTFP y OHTFP mostraron espectros muy similares al presente en la figura anterior.

El rendimiento para la síntesis de la FTFP fue de 19.1% y los espectros de $^1\text{HRMN}$ (**Figura 15**) y UV-Visible mostraron las siguientes señales: $^1\text{HRMN}$ (CDCl_3 , ppm, 600 MHz) 8.82 (s, 8H), 8.16-8.16 (d, 8H, $J = 8.16$ Hz), 8.15-8.14 (d, 8H, $J = 8.16$ Hz), -2.85 (s, 2H); UV-Vis (CHCl_3 : nm, absorbancia): λ 515 (1.117), 550 (0.468), 591 (0.363), 647 (0.297).

A.



B.

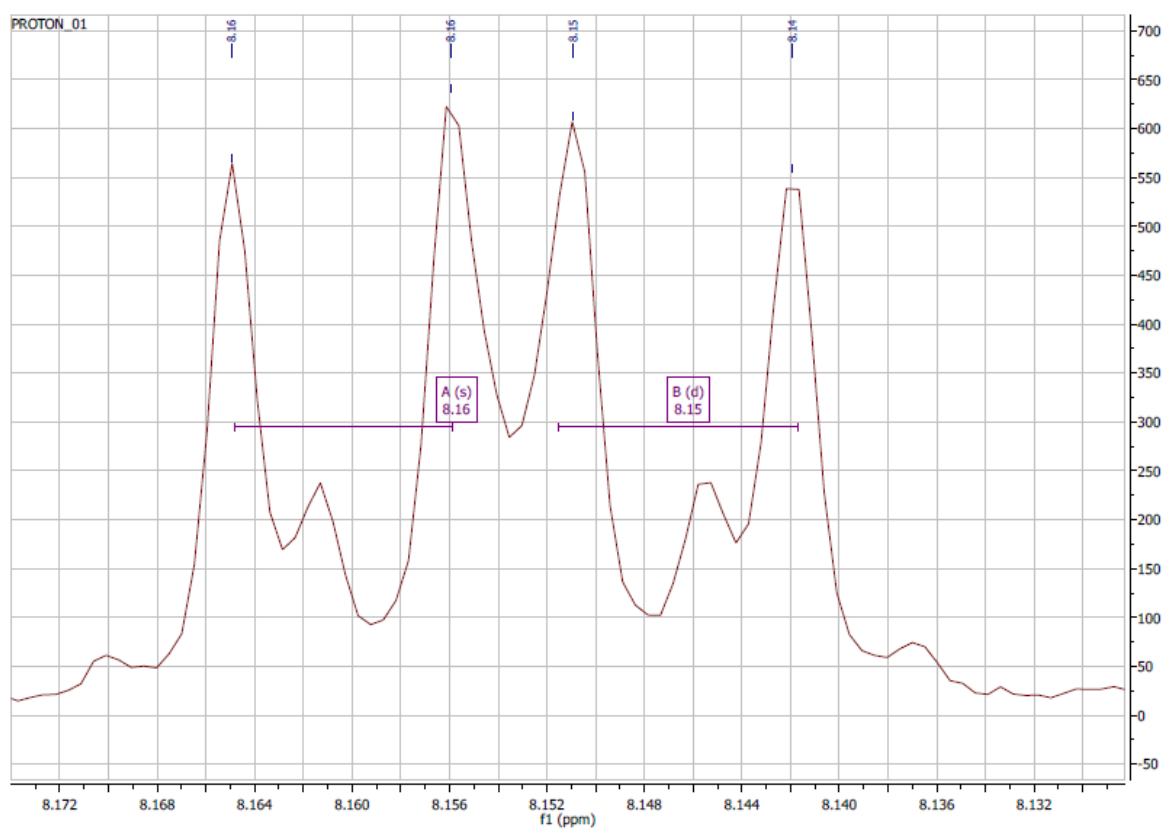
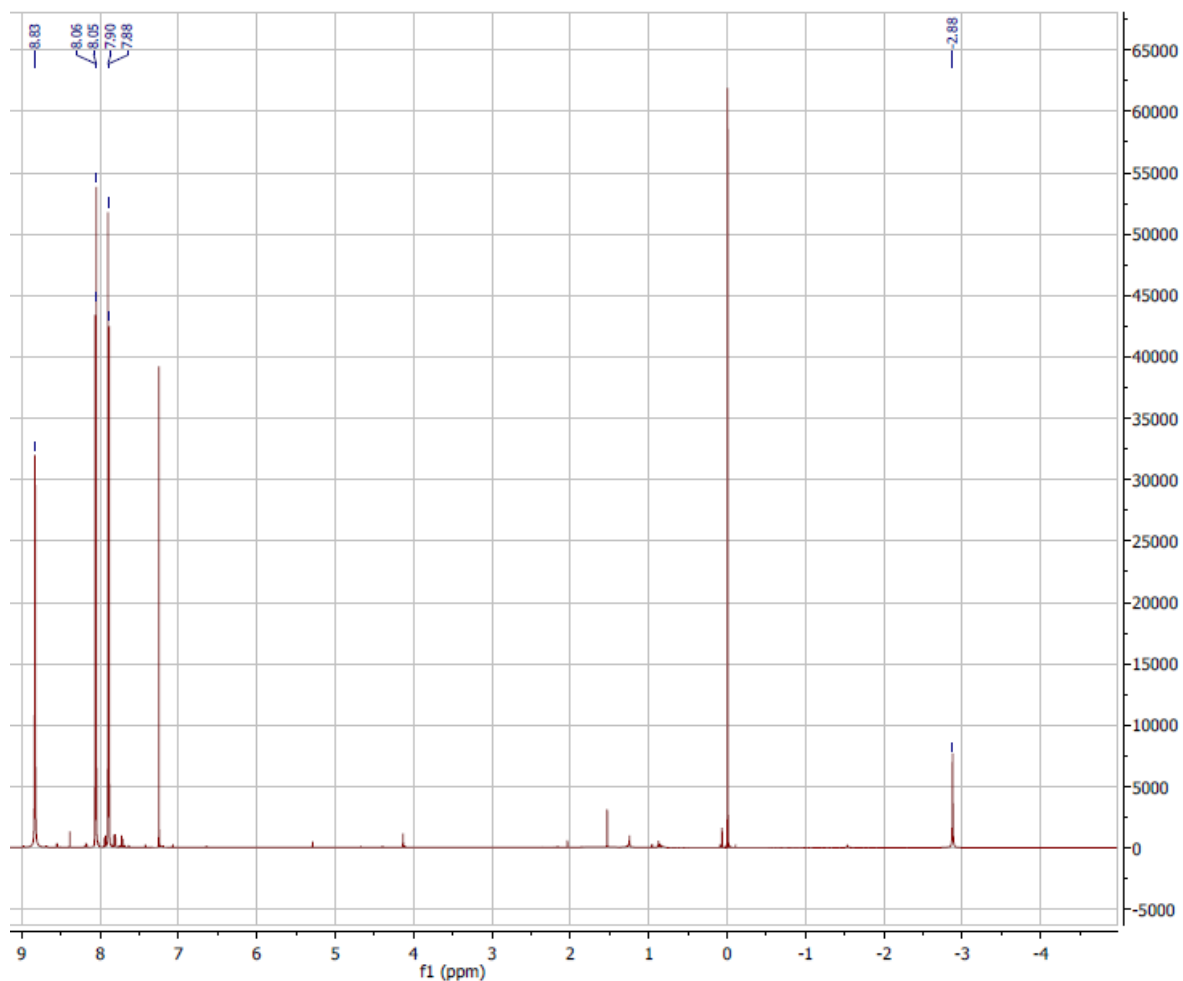


Figura 15. Espectro de ^1H RMN para la FTFP a 600 MHz en CDCl_3 . A. Se muestran todas las señales de interés. B. Esta expansión muestra la presencia de dos dobles con su respectiva constante de acoplamiento.

El rendimiento para la síntesis de la CITFP fue de 18.1% y los espectros de $^1\text{HRMN}$ (**Figura 16**) y UV-Visible mostraron las siguientes señales: $^1\text{HRMN}$ (CDCl_3 , ppm, 600 MHz) 8.83 (s, 8H), 8.06-8.05 (d, 8H, $J = 8.05$ Hz), 7.90-7.88 (d, 8H, $J = 8.05$ Hz), -2.88 (s, 2H); UV-Vis (CHCl_3 : nm, absorbancia): λ 515 (2.610), 550 (1.142), 591 (0.812), 647 (0.580).

A.



B.

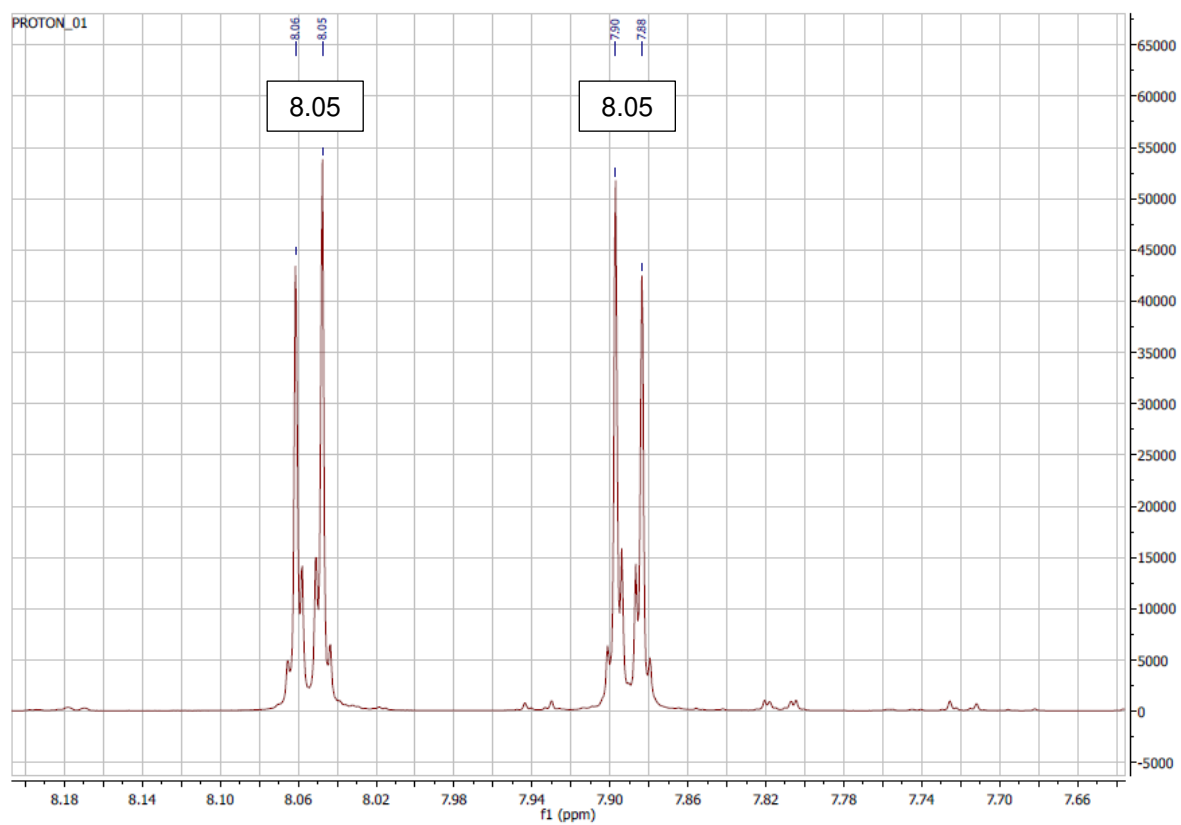
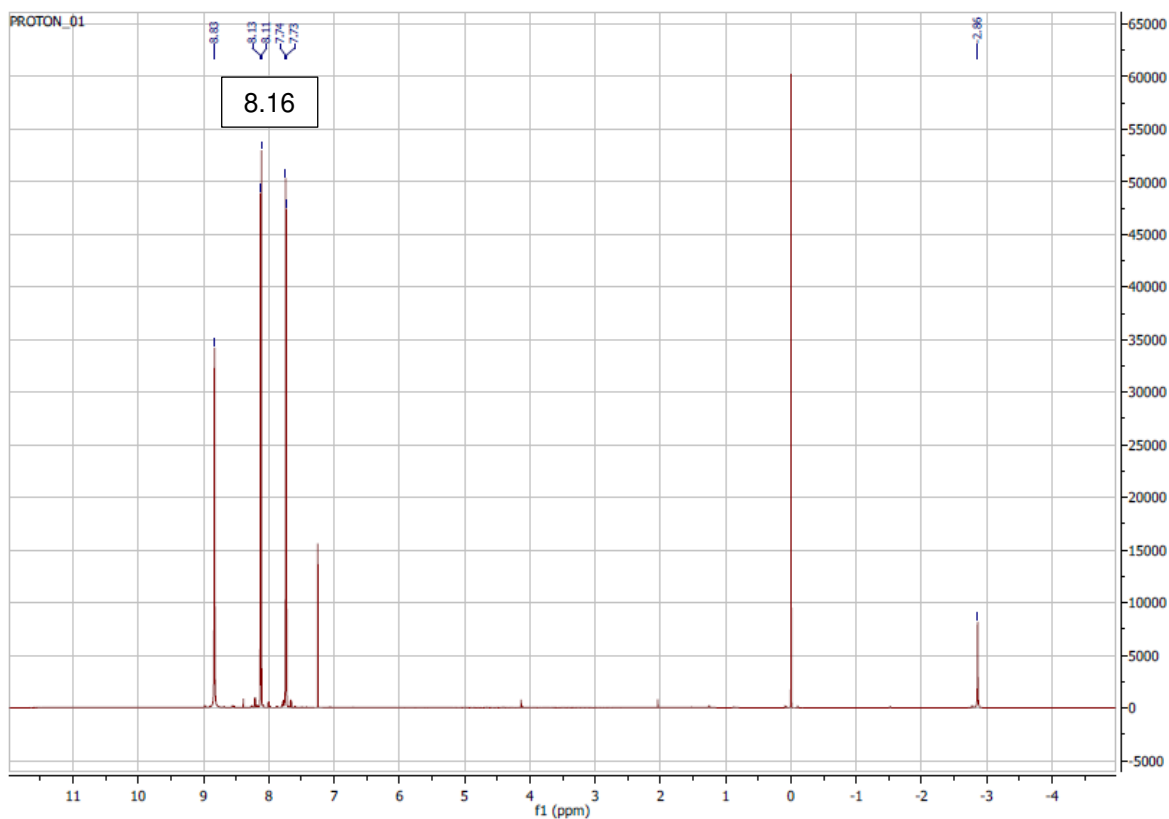


Figura 16. Espectro de ^1H RMN para la CITFP a 600 MHz en CDCl_3 . Se muestran todas las señales de interés. B. Esta expansión muestra la presencia de dos dobles con su respectiva constante de acoplamiento.

El rendimiento para la síntesis de la BrTFP fue de 18.7% y los espectros de ^1H RMN (**Figura 17**) y UV-Visible mostraron las siguientes señales: ^1H RMN (CDCl_3 , ppm, 600 MHz) 8.83 (s, 8H), 8.13-8.11 (d, 8H, $J = 8.12$ Hz), 7.74-7.73 (d, 8H, $J = 8.12$ Hz), -2.86 (s, 2H); UV-Vis (CHCl_3 : nm, absorbancia): λ 516 (1.941), 551 (0.875), 591 (0.610), 647 (0.438).

A.



B.

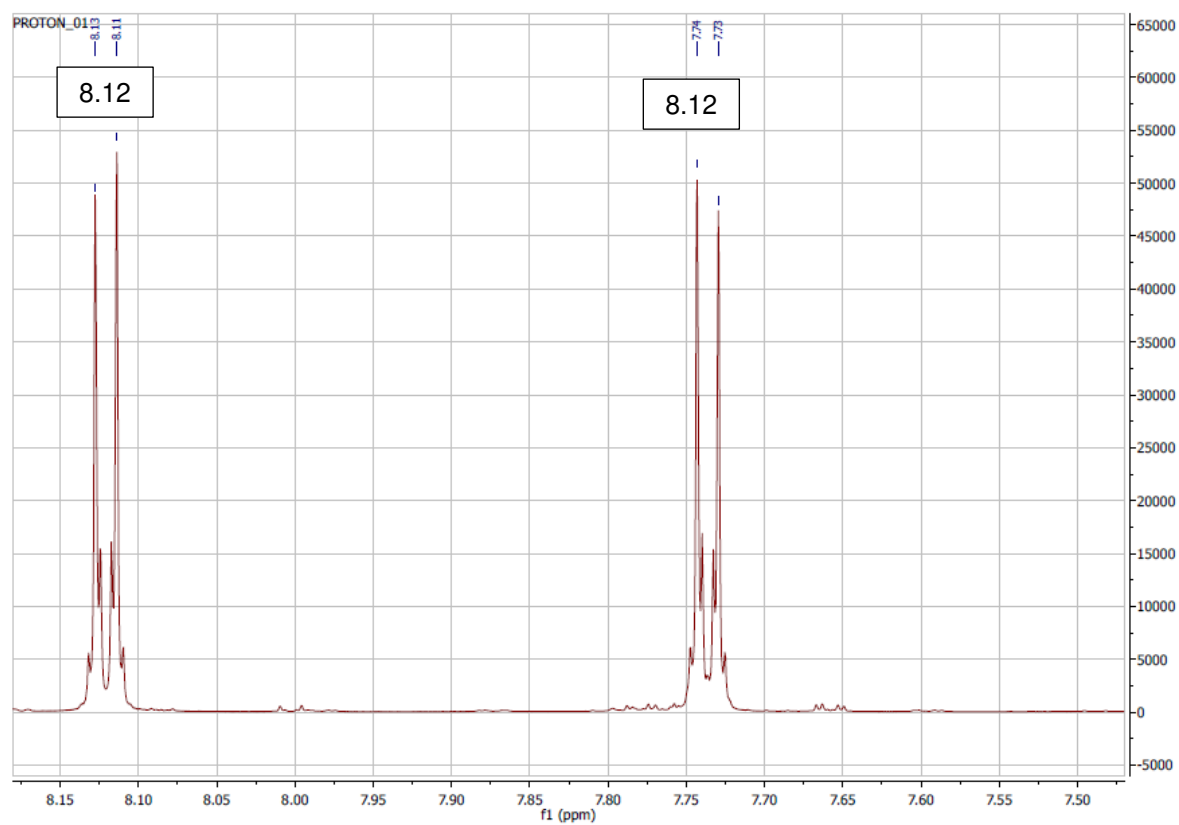
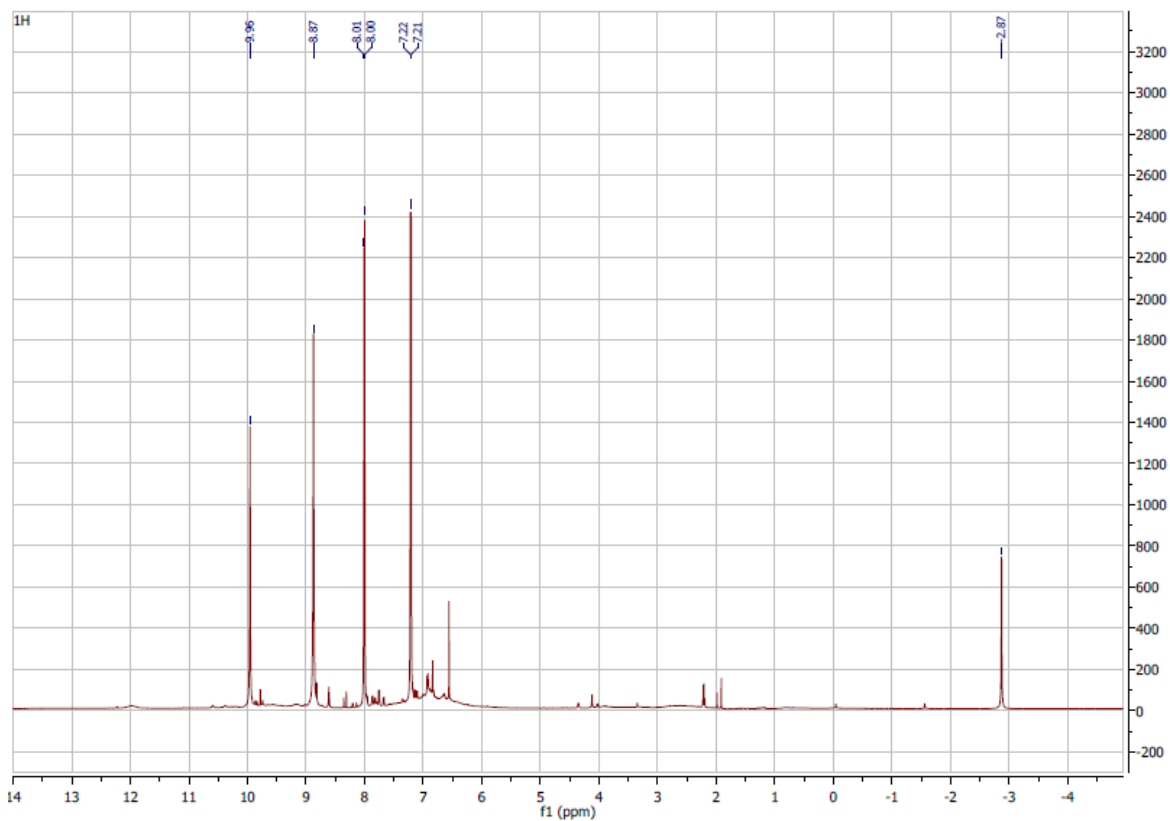


Figura 17. Espectro de ^1H RMN para la BrTFP a 600 MHz en CDCl_3 . Se muestran todas las señales de interés. B. Esta expansión muestra la presencia de dos dobles con su respectiva constante de acoplamiento.

El rendimiento para la síntesis de la OHTFP fue de 23.5% y los espectros de $^1\text{HMRN}$ (**Figura 18**) y UV-Visible mostraron las siguientes señales: $^1\text{HMRN}$ (DMSO- d_6 , ppm, 600 MHz) 9.96 (s, 4H), 8.87 (s, 8H), 8.01-8.00 (d, 8H, $J = 8.01$ Hz), 7.22-7.21 (d, 8H, $J = 8.01$ Hz), -2.87 (s, 2H); UV-Vis (MeOH: nm, absorbancia): λ 516 (1.628), 554 (1.299), 592 (0.682), 650 (0.749).

A.



B.

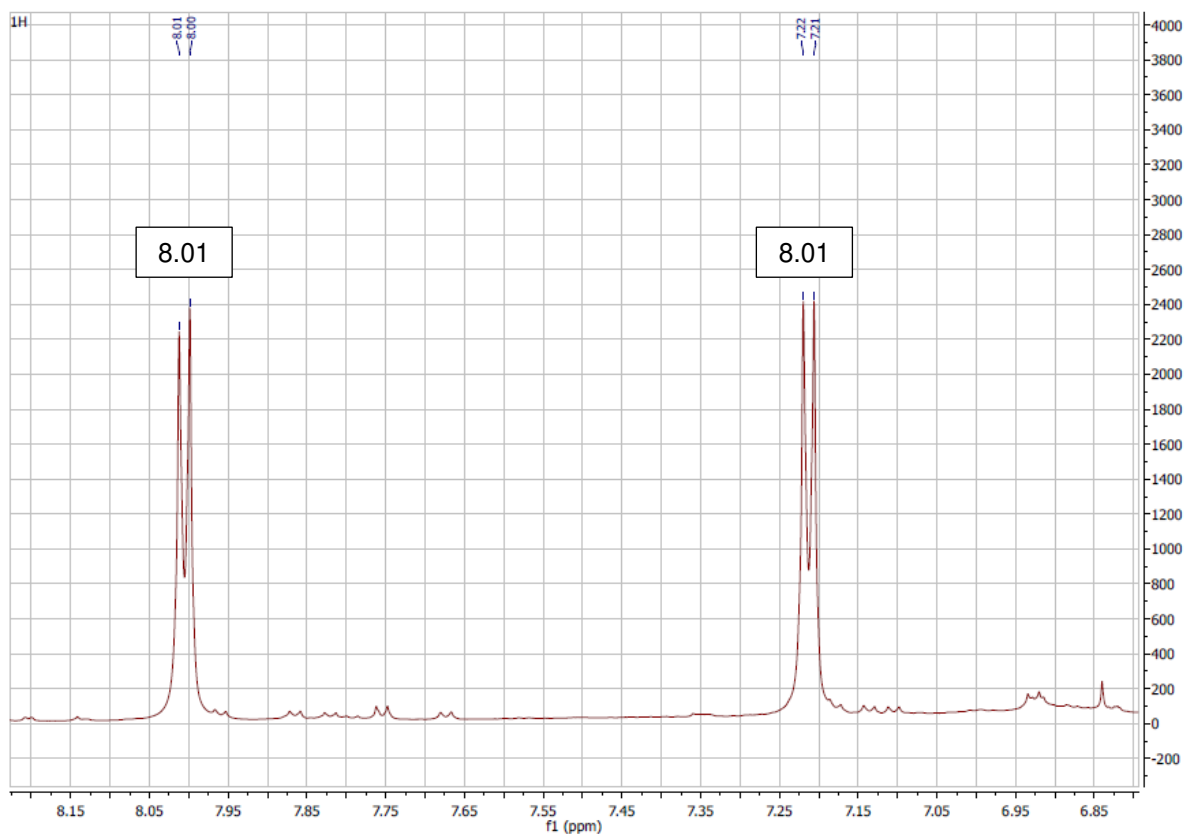
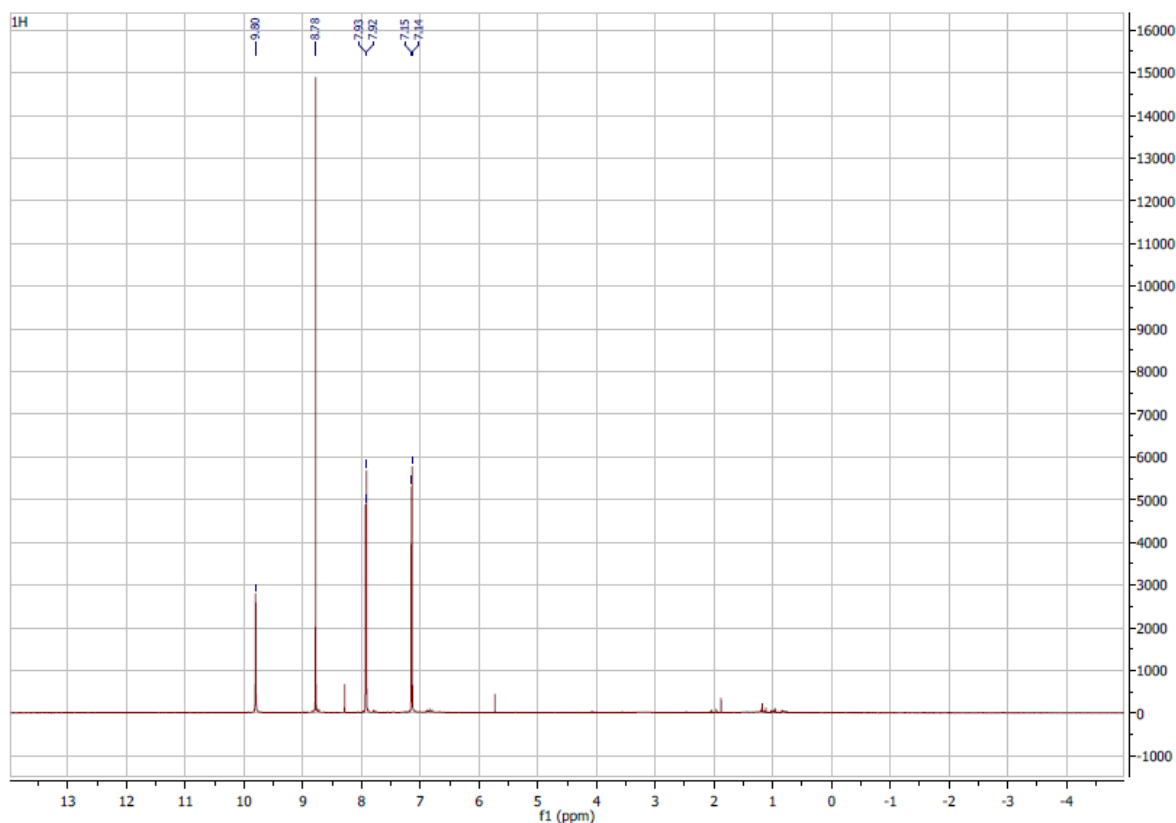


Figura 18. Espectro de ^1H RMN para la OHTFP a 600 MHz en DMSO-d_6 . Se muestran todas las señales de interés. B. Esta expansión muestra la presencia de dos dobles con su respectiva constate de acoplamiento.

El rendimiento para la síntesis de la Zn-OHTFP fue de 52.5% y los espectros de ^1H RMN (**Figura 19**) y UV-Visible (**Figura 20**) mostraron las siguientes señales: ^1H RMN (DMSO- d_6 , ppm, 600 MHz) 9.80 (s, 4H), 8.87 (s, 8H), 7.93-7.92 (d, 8H, $J = 7.92$ Hz), 7.15-7.14 (d, 8H, $J = 7.92$ Hz); UV-Vis (MeOH: nm, absorbancia): λ 559 (2.296), 600 (1.457).

A.



B.

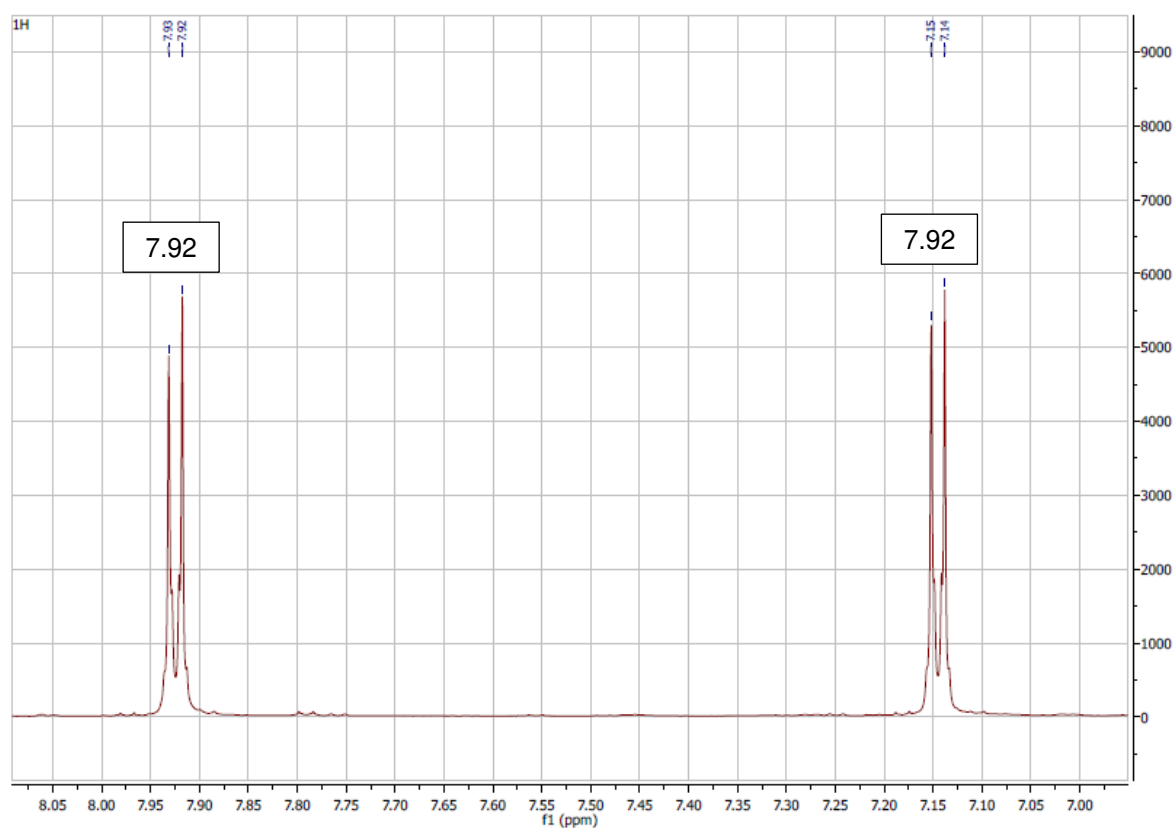


Figura 19. Espectro de ^1H RMN para la Zn-OHTFP a 600 MHz en DMSO-d_6 . Se muestran todas las señales de interés. B. Esta expansión muestra la presencia de dos dobles con su respectiva constante de acoplamiento.

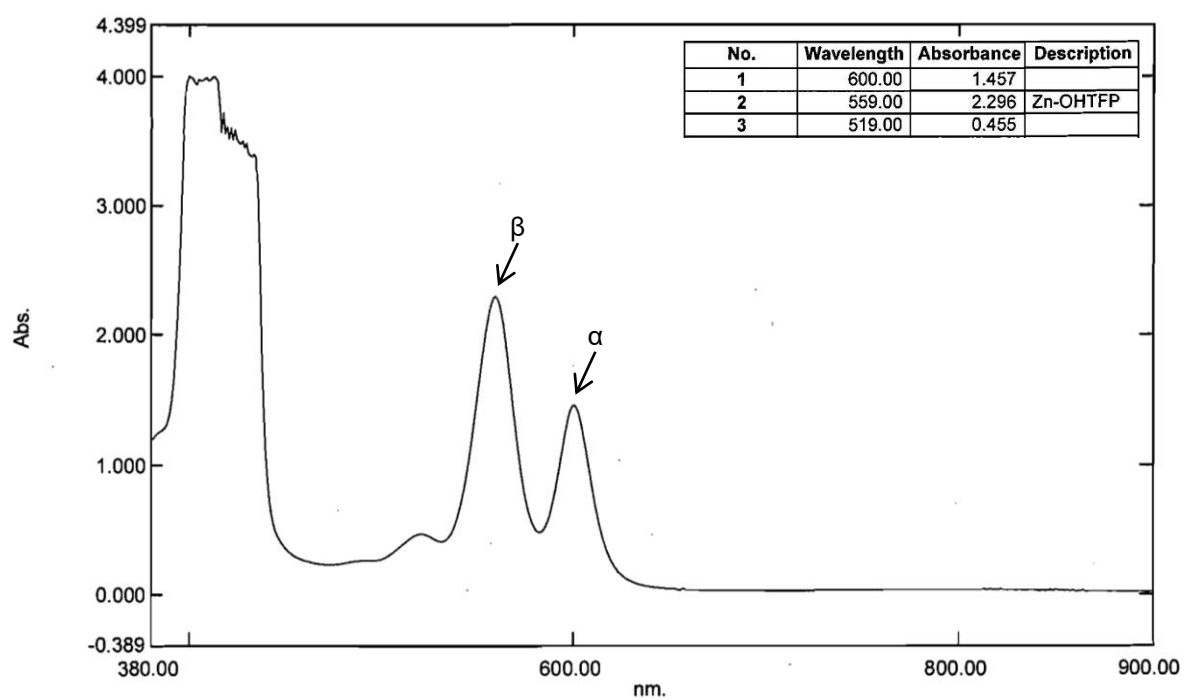


Figura 20. Espectro de absorción UV-Visible de la Zn-OHTFP en MeOH a una concentración de 0.1 mg/mL.

7.2. Ensayos *in vitro*

7.2.1. Estandarización de la metodología para la determinación de la citotoxicidad intrínseca y la fototoxicidad

Los compuestos TFP, FTFP, CITFP y BrTFP no mostraron actividad biológica. Se desconoce si esto se debió a que no la presentan o si las células no fueron capaces de absorberlos debido a su falta de solubilidad en el medio de cultivo. Después de 24 horas se podían apreciar partículas precipitadas en los pozos. Los compuestos OHTFP y Zn-OHTFP sí mostraron bioactividad y los resultados se muestran a continuación.

La **Figura 21** muestra la curva del %viabilidad dependiente de la concentración para la OHTFP. Este compuesto mostró distintas IC_{50} en función del tiempo de exposición a la radiación (**Tabla 1, Figura 22**).

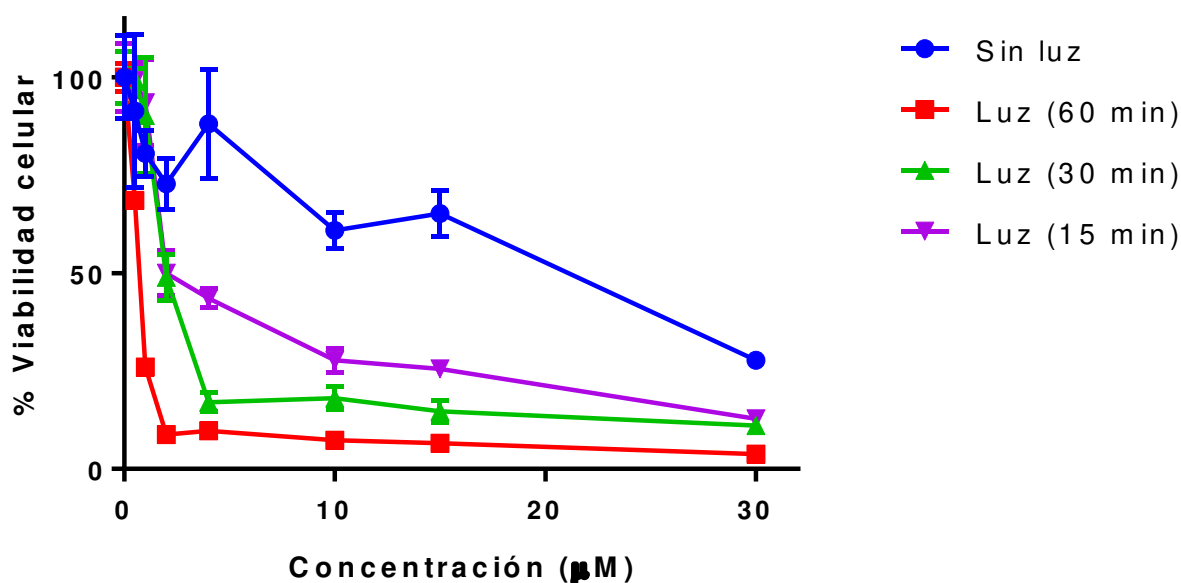


Figura 21. Porcentaje de viabilidad celular obtenido con células HeLa en función de distintas concentraciones de OHTFP y tiempos de exposición a la luz roja. El intervalo de concentraciones utilizadas fue de 0-30 µM. Los datos se expresan como la media \pm E.E.

Tabla 1. Valores de IC_{50} de la OHTFP a diferentes tiempos de radiación.

Tiempo (minutos)	IC_{50} (μM) \pm E.E.
60	0.54 ± 0.06
30	2.10 ± 0.26
15	2.35 ± 0.39
0	16.35 ± 2.72

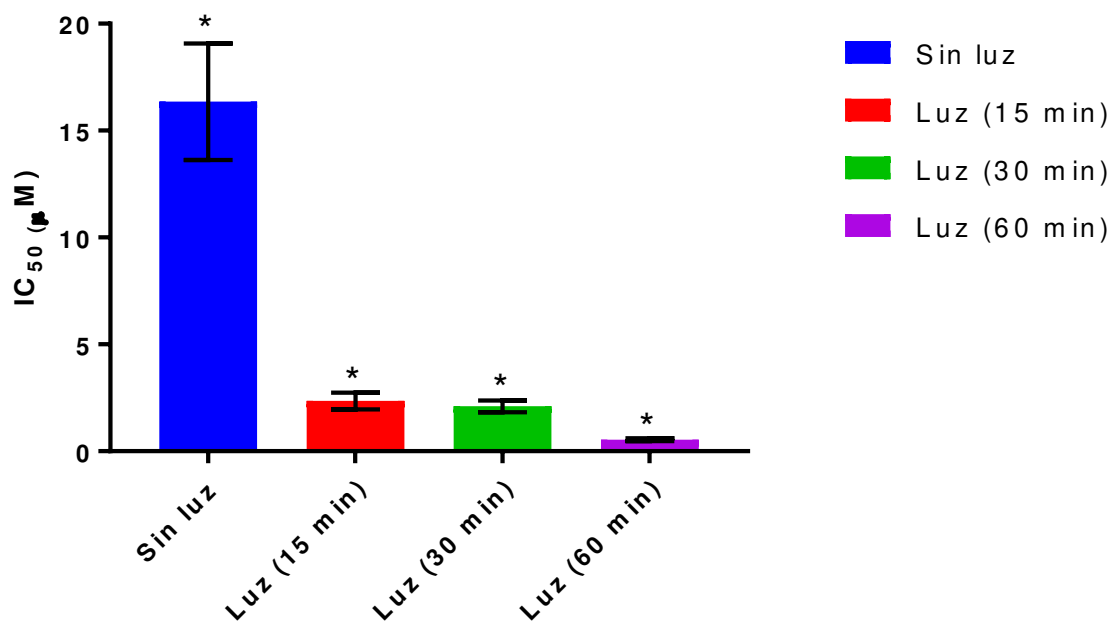


Figura 22. Las barras representan los valores de IC_{50} obtenidos 24 horas después de aplicar luz roja durante 0, 15, 30 y 60 minutos. Los datos se expresan como la media \pm E.E. y fueron analizados mediante la prueba t-Student, seguido por la prueba de Bonferroni-Dunn. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran como $p < 0.000001$ al comparar los valores obtenidos de las IC_{50} a los 15 y 30 minutos con el control (Sin luz).

7.2.2. Determinación de la citotoxicidad intrínseca y la fototoxicidad de Zn-OHTFP

La **Figura 23** muestra la curva del %viabilidad dependiente de la concentración para la Zn-OHTFP. Este compuesto no mostró grandes diferencias entre sus IC₅₀ obtenidas a distintos tiempos de exposición a la radiación (**Tabla 2, Figura 24**).

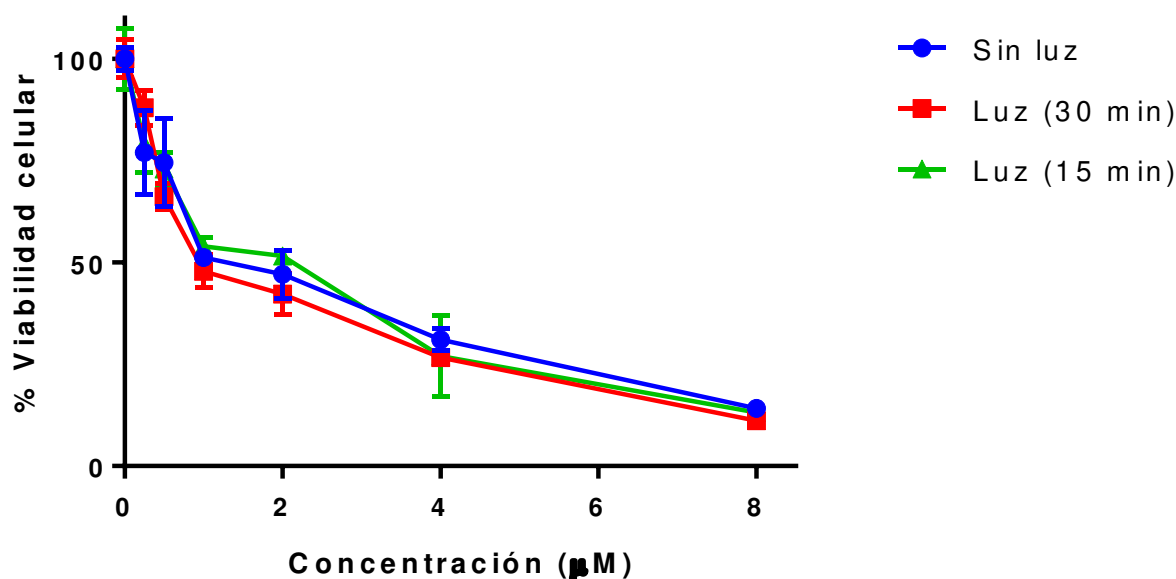


Figura 23. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en función de distintas concentraciones de Zn-OHTFP y tiempos de exposición a la luz roja. El intervalo de concentraciones utilizadas fue de 0-8 µM. Los datos se expresan como la media ± E.E.

Tabla 2. Valores de IC₅₀ de la Zn-OHTFP a diferentes tiempos de radiación.

Tiempo (minutos)	IC ₅₀ (µM) ± E.E.
30	1.18 ± 0.07
15	1.43 ± 0.12
0	1.38 ± 0.12

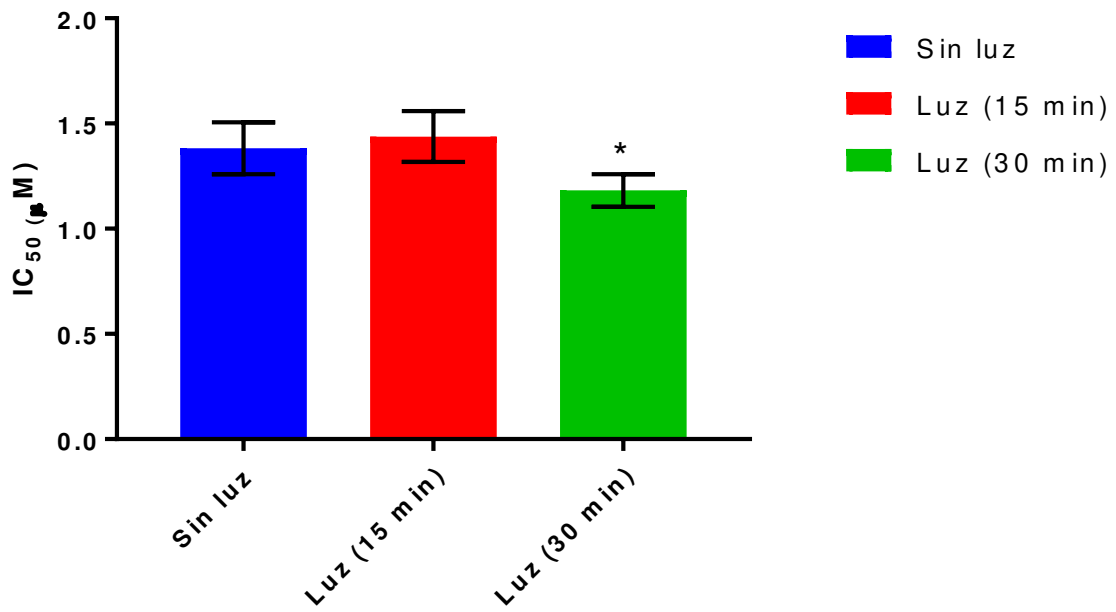


Figura 24. Las barras representan los valores de IC₅₀ obtenidos 24 horas después de aplicar luz roja durante 0, 15 y 30 minutos. Los datos se expresan como la media \pm E.E. y fueron analizados mediante la prueba t-Student, seguido por la prueba de Bonferroni-Dunn. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran como $p < 0.000001$ al comparar los valores obtenidos de las IC₅₀ a los 15 y 30 minutos con el control (Sin luz).

7.2.3. Comparación del efecto citotóxico intrínseco y fototoxicidad de OHTFP y Zn-OHTFP

La **Figura 25 y Tabla 3** muestran la comparación de los valores de IC_{50} obtenidos para ambas porfirinas 24 horas después de aplicar luz roja durante 0, 15 y 30 minutos.

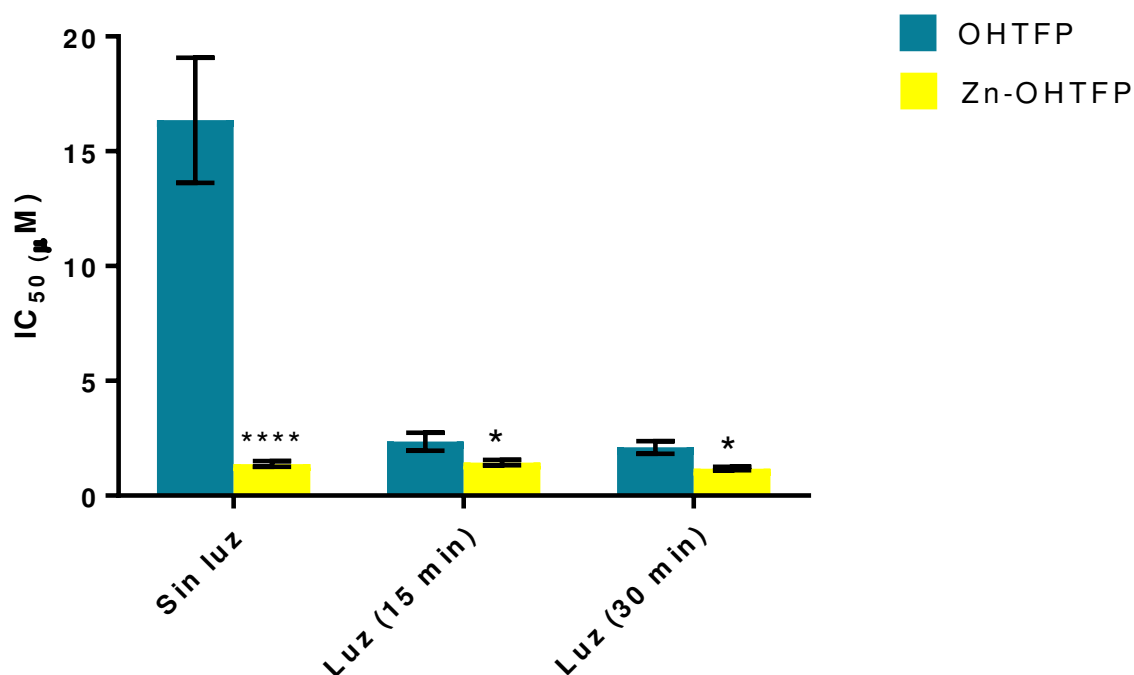


Figura 25. Las barras representan los valores de IC_{50} de OHTFP y Zn-OHTFP, obtenidos 24 horas después de aplicar luz roja durante 0, 15 y 30 minutos. Los datos se expresan como la media \pm E.E. y fueron analizados mediante ANOVA de dos factores, seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las diferencias estadísticamente significativas de las IC_{50} de ambas porfirinas se muestran como $p < 0.05$ y $p < 0.0001$, al ser comparadas entre sí a los 0, 15 y 30 minutos de radiación.

Tabla 3. Comparaciones de los valores de IC_{50} de OHTFP y Zn-OHTFP a diferentes tiempos de radiación.

Compuesto	IC_{50} (µM) a 0 minutos	IC_{50} (µM) a 15 minutos	IC_{50} (µM) a 30 minutos
OHTFP	16.35 \pm 2.72	2.35 \pm 0.39	2.10 \pm 0.26
Zn-OHTFP	1.38 \pm 0.12	1.43 \pm 0.12	1.18 \pm 0.07

8. Discusión

8.1. Elucidación estructural

El espectro de $^1\text{HRMN}$ de la TFP mostró cuatro grupos de señales, de las cuales, la señal -2.73 ppm (s, 2H) se debe a los protones internos del macrociclo. Esta señal es característica de las porfirinas en su forma de base libre, es decir, sin tener unido un átomo metálico en el interior de su núcleo. Los electrones π que participan en el sistema de resonancia (corriente anular) generan un campo magnético inducido, donde los protones internos del anillo experimentan un campo magnético local, en el cual, las corrientes anisotrópicas tienen un sentido contrario al campo magnético externo. Esto se traduce en un efecto de protección y desplaza los núcleos a menor frecuencia (91).

Las señales de 8.25 - 8.24 ppm (d, 8H) y 7.77 ppm (m, 12H) pertenecen a los protones aromáticos del grupo fenilo. Este tipo de hidrógenos se ven afectados por los efectos de anisotropía de este anillo, de forma semejante al caso anterior, sin embargo, ahora la corriente anisotrópica posee el mismo sentido que el campo magnético externo, lo que da como resultado el desplazamiento de estas señales a mayor frecuencia. El doble de 8.25 - 8.24 ppm es el de los hidrógenos H_2 y H_6 (**Figura 26**) y el múltiple de 7.77 ppm se debe a los protones H_3 , H_4 , H_5 . El desplazamiento a campos bajos de estos núcleos también se debe al efecto electroatrayente del núcleo de porfirina. La influencia es mayor para los protones en posición *orto*, pertenecientes al doble, y menor para los *para* y *meta*, pertenecientes al múltiple. Todos ellos están acoplados.

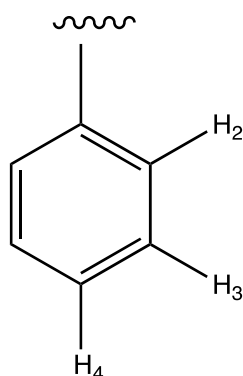


Figura 26. Hidrógenos del grupo fenilo.

El espectro de absorción UV-Visible muestra la presencia de las cinco bandas características de una porfirina en su forma de base libre (Banda de Soret y bandas IV, III, II, I, también conocidas como bandas Q) (2). Se trata de un espectro de tipo etio.

Con base en los resultados se propone la siguiente estructura:

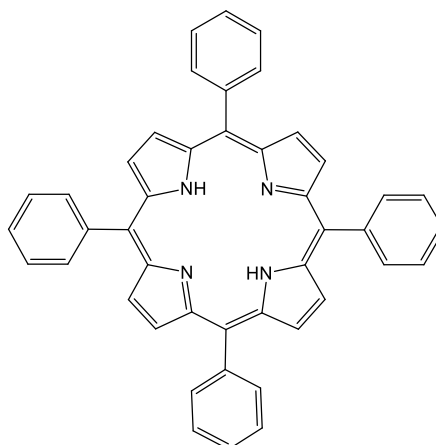


Figura 27. Estructura de la TFP.

El espectro de $^1\text{HRMN}$ de la FTFP mostró cuatro grupos de señales, de las cuales, la señal -2.85 ppm (s, 2H) se debe a los protones internos del macrociclo.

Las señales de 8.16 ppm (d, 8H) y 7.28 ppm (d, 8H) pertenecen a los protones aromáticos del grupo arilo disustituido. Este tipo de hidrógenos se ven afectados por los efectos de anisotropía de este anillo, de forma semejante al caso anterior, sin embargo, ahora la corriente anisotrópica posee el mismo sentido que el campo

magnético externo, lo que da como resultado el desplazamiento de estas señales a mayor frecuencia. El doble de 8.16 ppm es el de los hidrógenos H₃ y H₅ (**Figura 28**) y el doble de 7.28 ppm se debe a los protones H₂ y H₆. El desplazamiento a mayor frecuencia de estos núcleos también se debe al efecto electroatrayente del átomo de flúor y del núcleo de porfirina. Los protones H₃ y H₅ son equivalentes, aparecen a menor frecuencia porque el átomo de flúor ejerce un efecto electroatrayente más grande que el núcleo de porfirina y aparecen como doble porque tienen dos protones equivalentes con quien acoplarse, es decir, los protones H₂ y H₆. Estos últimos aparecen a menor frecuencia por lo mencionado anteriormente y también aparecen como un doble al acoplarse con los protones H₃ y H₅.

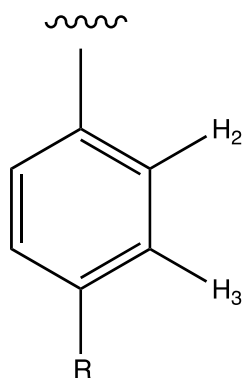


Figura 28. Hidrógenos del grupo fenilo *para-sustituido*.

La última señal de 8.82 ppm (s, 8H) pertenece a los protones en posición β del pirrol. Aparecen como un simple dado que son equivalentes y no poseen núcleos adyacentes con los que puedan acoplarse.

El espectro de absorción UV-Visible nuevamente es de tipo etio y muestra la presencia de las cuatro bandas Q, indicando que la porfirina se encuentra en su forma de base libre.

Con base en los resultados se propone la siguiente estructura:

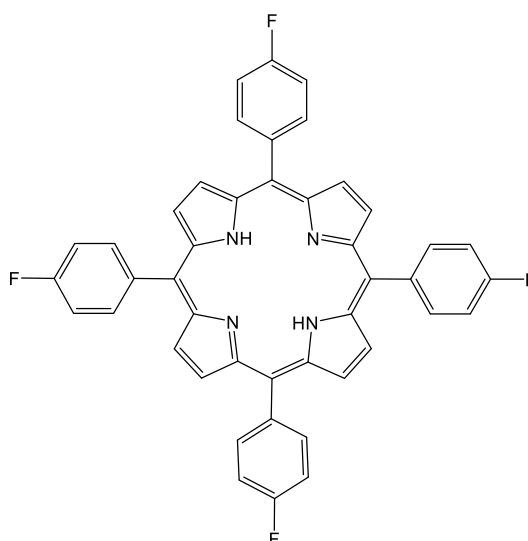


Figura 29. Estructura de la FTFP.

El espectro de $^1\text{HMRN}$ de la CITFP mostró cuatro grupos de señales, de las cuales, la señal -2.88 ppm (s, 2H) se debe a los protones internos del macrociclo. Las señales de 8.06-8.05 ppm (d, 8H) y 7.90-7.88 ppm (d, 8H) pertenecen a los protones aromáticos del grupo arilo disustituido. El doble de 8.06-8.05 ppm es el de los hidrógenos H_3 y H_5 y el doble de 7.90-7.88 ppm se debe a los protones H_2 y H_6 . El desplazamiento a mayor frecuencia de estos núcleos también se debe al efecto electroatrayente del átomo de cloro y del núcleo de porfirina. Los protones H_3 y H_5 son equivalentes, aparecen a mayor frecuencia porque el átomo de cloro ejerce un efecto electroatrayente más grande que el núcleo de porfirina y aparecen como un doble porque tienen dos protones equivalentes con quien acoplarse, es decir, los protones H_2 y H_6 . Estos últimos aparecen a mayor frecuencia por lo mencionado anteriormente y también aparecen como un doble al acoplarse con los protones H_3 y H_5 . La última señal de 8.83 ppm (s, 8H) pertenece a los protones en posición β del pirrol. Aparecen como un simple dado que son equivalentes y no poseen núcleos adyacentes con los que puedan acoplarse.

El espectro de absorción UV-Visible nuevamente es de tipo etio y muestra la presencia de las cuatro bandas Q, indicando que la porfirina se encuentra en su forma de base libre.

Con base en los resultados se propone la siguiente estructura:

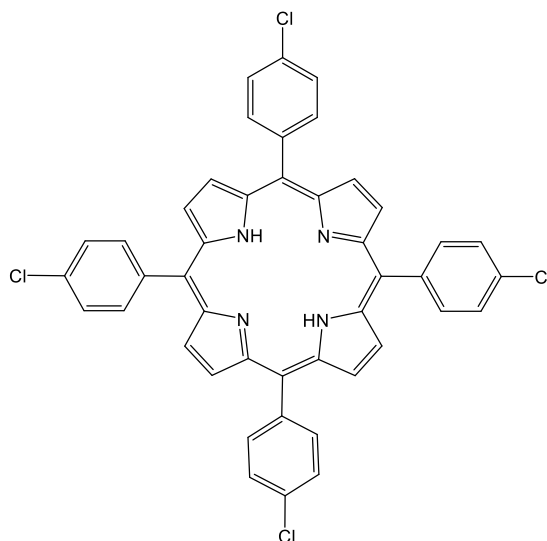


Figura 30. Estructura de la CITFP.

El espectro de $^1\text{HRMN}$ de la BrTFP mostró cuatro grupos de señales, de las cuales, la señal -2.86 ppm (s, 2H) se debe a los protones internos del macrociclo. Las señales de $8.13-8.11$ ppm (d, 8H) y $7.74-7.73$ ppm (d, 8H) pertenecen a los protones aromáticos del grupo arilo disustituido. El doble de $8.13-8.11$ ppm es el de los hidrógenos H_3 y H_5 y el doble de $7.74-7.73$ ppm se debe a los protones H_2 y H_6 . El desplazamiento a mayor frecuencia de estos núcleos también se debe al efecto electroatrayente del átomo de bromo y del núcleo de porfirina. Los protones H_3 y H_5 son equivalentes, aparecen a menor frecuencia porque el átomo de bromo ejerce un efecto electroatrayente más grande que el núcleo de porfirina y aparecen como un doble porque tienen dos protones equivalentes con quien acoplarse, es decir, los protones H_2 y H_6 . Estos últimos aparecen a menor frecuencia por lo mencionado anteriormente y también aparecen como un doble al acoplarse con los protones H_3 y H_5 .

La última señal de 8.83 ppm (s, 8H) pertenece a los protones en posición β del pirrol. Aparecen como un simple dado que son equivalentes y no poseen núcleos adyacentes con los que puedan acoplarse.

El espectro de absorción UV-Visible nuevamente es de tipo etio y muestra la presencia de las cuatro bandas Q, indicando que la porfirina se encuentra en su forma de base libre.

Con base en los resultados se propone la siguiente estructura:

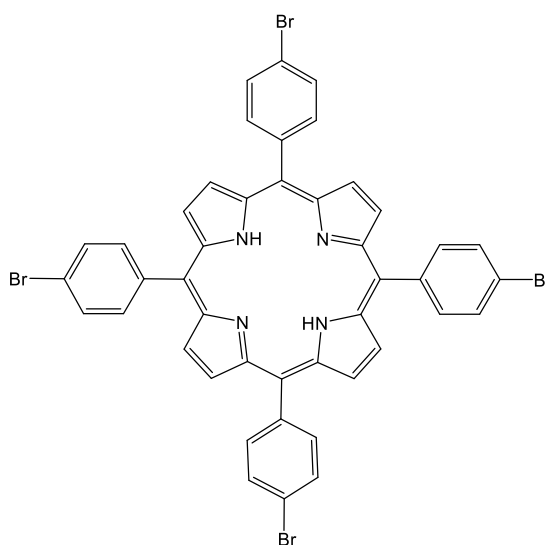


Figura 31. Estructura de la BrTFP.

El espectro de $^1\text{HRMN}$ de la OHTFP mostró cinco grupos de señales, de las cuales, la señal -2.87 ppm (s, 2H) se debe a los protones internos del macrociclo. Las señales de 8.01-8.00 ppm (d, 8H) y 7.22-7.21 ppm (d, 8H) pertenecen a los protones aromáticos del grupo arilo disustituido. El doble de 8.01-8.00 ppm es el de los hidrógenos H_2 y H_6 y el doble de 7.22-7.21 ppm se debe a los protones H_3 y H_5 .

Los protones H_2 y H_6 son equivalentes, aparecen a mayor frecuencia debido al efecto electroatrayente del núcleo de porfirina y aparecen como un doble porque tienen dos protones equivalentes con quien acoplarse, es decir, los protones H_3 y H_5 .

Estos últimos aparecen a menor frecuencia porque el grupo hidroxilo ejerce un efecto electrodonador que los protege. También aparecen como un doble al acoplarse con los protones H₂ y H₆.

La señal de 8.87 ppm (s, 8H) pertenece a los protones en posición β del pirrol. Aparecen como un simple dado que son equivalentes y no poseen núcleos adyacentes con los que puedan acoplarse.

Finalmente, la señal de 9.96 ppm (s, 4H) pertenece a los protones de los grupos hidroxilo. Aparecen como un simple dado que son equivalentes y no poseen núcleos adyacentes con los que puedan acoplarse.

El espectro de absorción UV-Visible nuevamente es de tipo etio y muestra la presencia de las cuatro bandas Q, indicando que la porfirina se encuentra en su forma de base libre.

Con base en los resultados se propone la siguiente estructura:

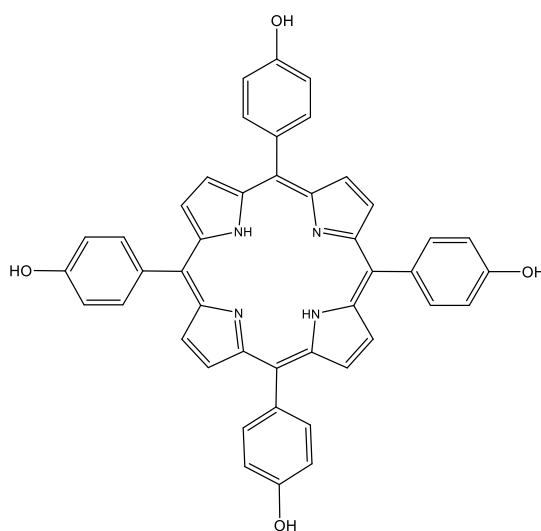


Figura 32. Estructura de la OHTFP.

El espectro de ¹HRMN de la Zn-OHTFP mostró cuatro grupos de señales. La señal característica de los protones internos desapareció, lo cual da indicio a que la inserción del metal se llevó a cabo con éxito.

Las señales de 7.93-7.92 ppm (d, 8H) y 7.15-7.14 ppm (d, 8H) pertenecen a los

protones aromáticos del grupo arilo disustituido. El doble de 7.93-7.92 ppm es el de los hidrógenos H₂ y H₆ y el doble de 7.15-7.14 ppm se debe a los protones H₃ y H₅.

Los protones H₂ y H₆ son equivalentes, aparecen a mayor frecuencia debido al efecto electroatrayente del núcleo de porfirina y aparecen como un doble porque tienen dos protones equivalentes con quien acoplarse, es decir, los protones H₃ y H₅.

Estos últimos aparecen a menor frecuencia porque el grupo hidroxilo ejerce un efecto electrodonador que los protege. También aparecen como un doble al acoplarse con los protones H₂ y H₆.

La señal de 8.78 ppm (s, 8H) pertenece a los protones en posición β del pirrol. Aparecen como un simple dado que son equivalentes y no poseen núcleos adyacentes con los que puedan acoplarse.

Finalmente, la señal de 9.80 ppm (s, 4H) pertenece a los protones de los grupos hidroxilo. Aparecen como un simple dado que son equivalentes y no poseen núcleos adyacentes con los que puedan acoplarse.

El espectro de absorción UV-Visible muestra la presencia de tres bandas. Las porfirinas que exhiben un espectro de absorción de tipo etio, al ser coordinadas con metales divalentes, resulta en una simplificación del espectro, manteniéndose la banda de Soret, pero sustituyéndose las cuatro bandas Q por dos nuevas bandas denominadas β y α. Estas últimas suelen aparecer entre 500 y 600 nm. Esto corrobora la presencia del átomo de zinc en el interior del anillo.

Con base en los resultados se propone la siguiente estructura:

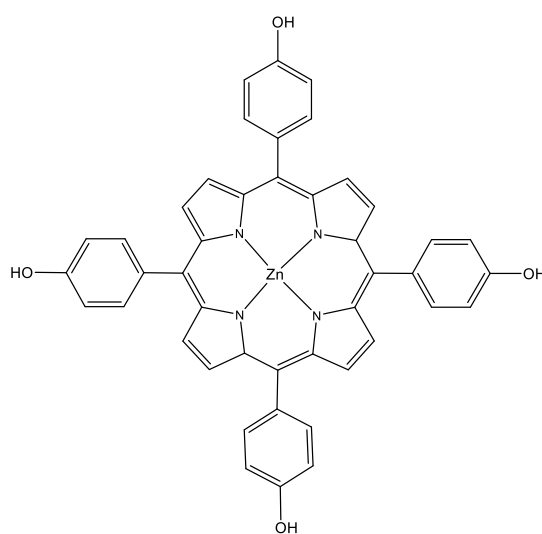


Figura 33. Estructura de la Zn-OHTFP

8.2. Análisis químico farmacéutico de TFP, FTFP, CITFP y BrTFP

A pesar de no haber sido posible evaluar la actividad biológica de las porfirinas que presentaron problemas de solubilidad, se pueden hacer algunas especulaciones respecto a sus probables comportamientos tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, la TFP podría presentar una farmacocinética favorecida. Al poseer bencenos monosustituídos, los cuales son grupos metabofóricos, pueden ser biotransformados rápidamente por acción del CYP450, resultando en la hidroxilación de la posición *para*. Esto puede aumentar la polaridad de la molécula, facilitando su posterior excreción en orina y heces. De no ocurrir esto, puede pasar a la fase dos y formar glucurónidos, para finalmente poder ser excretados en orina y heces (92). Estos anillos de benceno también podrían mejorar la permeabilidad a través de las membranas celulares ya que aumentan el carácter lipofílico (93), mejorando el efecto fototóxico del compuesto (88). La fototoxicidad también puede ser favorecida por la banda I presente en el espectro de absorción UV-Visible. Esta posee buena intensidad (0.740) y aparece dentro de la región deseada que debe tener un fotosensibilizador (647 nm), que es de 600 a 800 nm, lo cual podría provocar buena absorción de la luz utilizada y generar EROs (12).

Las últimas tres porfirinas halogenadas, si bien podrían tener una buena permeabilidad a través de las membranas celulares (94), sus farmacocinéticas podrían verse afectadas en distintos grados. Por ejemplo, para la porfirina fluorada, el tiempo de vida media puede aumentar considerablemente debido a que el átomo de flúor en la posición *para* bloquea la actividad del CYP450 ya que el enlace entre éste y el átomo de carbono vecino es muy fuerte (114 kcal/mol), imposibilitando la oxidación del anillo de benceno; bajo este razonamiento, ocurriría el caso contrario con la OHTFP, ya que al estar hidroxilada, podría ser excretada rápidamente. Su banda I exhibe una intensidad pequeña (0.297), por lo que podría no presentar una buena absorción de la luz. Por otro lado, el tiempo de vida media de la porfirina clorada podría resultar menor dado que, a pesar de que el átomo de cloro está ocupando la posición *para* del benceno (fuerza de enlace:

72 kcal/mol), el CYP450 aún puede actuar y oxidarlo, resultando únicamente en un retardo de la biotransformación (92). Este ocurre gracias al proceso llamado desplazamiento NIH en el cual ocurre una transposición, llevándose a cabo primero la epoxidación del anillo, seguido de la apertura del epóxido generado y el reordenamiento del átomo de cloro, el cual pasa de la posición *para* a la posición *meta*. Finalmente se genera un compuesto carbonílico en equilibrio tautomérico con su correspondiente fenol (95).

El tiempo de vida media de la porfirina bromada podría ser aún menor debido a que el enlace entre el átomo de bromo y el carbono vecino es muy lábil (59 kcal/mol). Su capacidad para absorber la luz, dada su intensidad (0.438), podría ser un poco menor que la de la porfirina clorada, sin embargo, al ser escindido el enlace entre el átomo de bromo y el carbono vecino por parte del CYP450, pueden generarse cationes bromonio, los cuales, al poseer un carácter marcadamente electrofílico se unirían a proteínas del hígado y riñones, causando efectos hepatotóxicos, nefrotóxicos, e incluso genotóxicos (96, 97).

8.3. Efecto de los sustituyentes *para* del grupo fenilo en la banda I de las porfirinas en su forma de base libre y citotoxicidad intrínseca y fototoxicidad ejercida por OHTFP y Zn-OHTFP

La presencia de grupos electrodonadores en la posición *meta* del benceno (Ph, OH) provoca que la banda I sea más intensa en comparación con la presencia de grupos electroattractores (F, Cl, Br). El grupo electrodonador más fuerte (OH) provocó también un ligero desplazamiento batocrómico (650 nm), mientras que la porfirina con el grupo electroattractor más fuerte (F) presentó la banda I menos intensa (0.297). Estos fenómenos podrían estar influenciados por el efecto inductivo y mesomérico que ejercen estos sustituyentes al sistema aromático.

En cuanto a la bioactividad, mientras mayor es el tiempo de exposición a la radiación de las células tratadas con OHTFP, mayor es el efecto fototóxico, aportando los 60 minutos de radiación el valor de IC₅₀ más bajo, seguido por 30 y

15 minutos. Todos los tiempos utilizados mostraron diferencias estadísticamente significativas muy grandes al ser comparados con las células no expuestas a la radiación (t-Student + Bonferroni-Dunn, $p < 0.000001$). Esto indica que el efecto fototóxico del compuesto está fuertemente influenciado por el tiempo que se expongan las células fotosensibilizadas con éste a la luz roja.

La Zn-OHTFP no mostró diferencia estadísticamente significativa entre las células sin exposición a la luz y las células expuestas por 15 minutos (t-Student, $p = 0.1451$). Fue hasta los 30 minutos de exposición que ocurrió esta significancia (t-Student + Bonferroni-Dunn, $p < 0.000001$). Esto probablemente se deba a la desaparición de la banda I (650 nm) y la aparición de la nueva banda α (600 nm) en el espectro de absorción UV-Visible al compararse con su forma de base libre (OHTFP). Las luces LED utilizadas emiten luz roja con una longitud de onda que oscila entre los 650 nm, por lo tanto, el compuesto es fotoinactivo o su capacidad para fotoactivarse disminuye drásticamente al utilizar luz con esta longitud de onda.

Por otro lado, esta porfirina presenta citotoxicidad intrínseca, incluso mayor que la fototoxicidad ejercida por la OHTFP a 15 y 30 minutos (ANOVA + Comparaciones múltiples, $p < 0.05$).

9. Conclusiones

- La presencia de grupos electrodonadores en el grupo fenilo favorece la absorción de luz roja ($\lambda \approx 650$ nm) en los derivados de la TFP.
- La actividad biológica como agente fotosensibilizador de la OHTFP depende en gran medida de su fotoactivación con luz roja de $\lambda \approx 650$ nm y de los tiempos de exposición a ésta.
- La inserción de cationes metálicos divalentes puede fotoinactivar a derivados de la TFP.
- La bioactividad de la Zn-OHTFP podría tener un mecanismo de acción diferente al de la OHTFP.
- Todas las evidencias encontradas sugieren que la OHTFP y la Zn-OHTFP son buenas candidatas para continuar con su evaluación en ensayos *in vivo*.

10. Bibliografía

1. Okura I. Photosensitization of Porphyrins and Phthalocyanines. 1 ed: Taylor & Francis; 2001.
2. Wijesekera TP, Dolphin D. Synthetic aspects of porphyrin and metalloporphyrin chemistry. Metalloporphyrins in catalytic oxidations. 1994;219-21.
3. Auwarter W, Eciya D, Klappenberger F, Barth JV. Porphyrins at interfaces. Nat Chem. 2015;7(2):105-20.
4. Yang X, Palasuberniam P, Kraus D, Chen B. Aminolevulinic Acid-Based Tumor Detection and Therapy: Molecular Mechanisms and Strategies for Enhancement. Int J Mol Sci. 2015;16(10):25865.
5. Chen J, Keltner L, Christophersen J, Zheng F, Krouse M, Singhal A, et al. New technology for deep light distribution in tissue for phototherapy. Cancer J. 2002;8(2):154-63.
6. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? Photochem Photobiol. 1992;55(1):145-57.
7. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbélik M, et al. Photodynamic Therapy. J Natl Cancer Inst. 1998;90(12):889-905.
8. Kelly JF, Snell ME. Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. J Urol. 1976;115(2):150-1.
9. Marmur ES, Schmults CD, Goldberg DJ. A Review of Laser and Photodynamic Therapy for the Treatment of Nonmelanoma Skin Cancer. Dermatol Surg. 2004;30:264-71.
10. Moore CM, Pendse D, Emberton M. Photodynamic therapy for prostate cancer[mdash]a review of current status and future promise. Nat Clin Pract Urol. 2009;6(1):18-30.
11. Park YK, Park CH. Clinical efficacy of photodynamic therapy. Obstet Gynecol Sci. 2016;59(6):479-88.
12. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, et al. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. CA-Cancer J Clin. 2011;61(4):250-81.

13. Cavaleiro JAS, Smith KM. Porphyrin Synthesis. *Rev Port Quím.* 1989;31(29).
14. Hiroto S, Miyake Y, Shinokubo H. Synthesis and Functionalization of Porphyrins through Organometallic Methodologies. *Chem Rev.* 2016.
15. Wijesekera TP, Dolphin D. Synthetic aspects of porphyrin and metalloporphyrin chemistry. *Metalloporphyrins in catalytic oxidations.* 1994:218.
16. Buchler JW. Synthesis and properties of metalloporphyrins. *The porphyrins.* 1978;1:390.
17. Kadish KM, Smith KM, Guillard R. *The Porphyrin Handbook: Synthesis and organic chemistry:* Academic Press; 2000.
18. Rothmund P. Formation of porphyrins from pyrrole and aldehydes. *J Am Chem Soc.* 1935;57(10):2010-1.
19. Rothmund P, Menotti AR. Porphyrin Studies. IV.1 The Synthesis of $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -Tetraphenylporphine. *J Am Chem Soc.* 1941;63(1):267-70.
20. Rothmund P, Menotti AR. Porphyrin Studies. V.1 The Metal Complex Salts of $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -Tetraphenylporphine. *J Am Chem Soc.* 1948;70(5):1808-12.
21. M. Drain C, Gong X. Synthesis of meso substituted porphyrins in air without solvents or catalysts. *Chem Commun.* 1997(21):2117-8.
22. Adler AD, Longo FR, Shergalis W. Mechanistic Investigations of Porphyrin Syntheses. I. Preliminary Studies on *ms*-Tetraphenylporphin. *J Am Chem Soc.* 1964;86(15):3145-9.
23. Adler AD, Longo FR, Finarelli JD, Goldmacher J, Assour J, Korsakoff L. A simplified synthesis for meso-tetraphenylporphine. *J Org Chem.* 1967;32(2):476-.
24. Lindsey JS, Schreiman IC, Hsu HC, Kearney PC, Marguerettaz AM. Rothmund and Adler-Longo reactions revisited: synthesis of tetraphenylporphyrins under equilibrium conditions. *J Org Chem.* 1987;52(5):827-36.
25. Lindsey JS, MacCrum KA, Tyhonas JS, Chuang YY. Investigation of a Synthesis of meso-Porphyrins Employing High Concentration Conditions and an Electron Transport Chain for Aerobic Oxidation. *J Org Chem.* 1994;59(3):579-87.

26. Lindsey JS, Hsu HC, Schreiman IC. Synthesis of tetraphenylporphyrins under very mild conditions. *Tetrahedron Lett.* 1986;27(41):4969-70.
27. Arsenault GP, Bullock E, MacDonald SF. Pyrromethanes and Porphyrins Therefrom. *J Am Chem Soc.* 1960;82(16):4384-9.
28. Woodward RB, Ayer WA, Beaton JM, Bickelhaupt F, Bonnett R, Buchschacher P, et al. The total synthesis of chlorophyll a. *Tetrahedron.* 1990;46(22):7599-659.
29. Brückner C, Posakony JJ, Johnson CK, Boyle RW, James BR, Dolphin D. Novel and improved syntheses of 5,15-diphenylporphyrin and its dipyrrolic precursors. *J Porphyr Phthalocya.* 1998;2(6):455-65.
30. Lee C-H, S. Lindsey J. One-flask synthesis of meso-substituted dipyrromethanes and their application in the synthesis of trans-substituted porphyrin building blocks. *Tetrahedron.* 1994;50(39):11427-40.
31. Sobral AJ, Rebanda NG, da Silva M, Lampreia SH, Silva MR, Beja AM, et al. One-step synthesis of dipyrromethanes in water. *Tetrahedron Lett.* 2003;44(20):3971-3.
32. Manka JS, Lawrence DS. High yield synthesis of 5,15-diarylporphyrins. *Tetrahedron Lett.* 1989;30(50):6989-92.
33. Briñas RP, Brückner C. Synthesis of 5,10-diphenylporphyrin. *Tetrahedron.* 2002;58(22):4375-81.
34. Karp G. *Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos.* 5 ed. México: McGraw-Hill; 2009.
35. *Testing Biopsy and Cytology Specimens for Cancer.* Atlanta: American Cancer Society; 2010.
36. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell.* 4 ed. New York: Garland Science; 2002.
37. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular Cell Biology.* New York: W. H. Freeman; 2000.
38. Broustas CG, Lieberman HB. DNA Damage Response Genes and the Development of Cancer Metastasis. *Radiat Res.* 2014;181(2):111-30.

39. Stephens FO, Aigner KR. Basics of Oncology. 1 ed: Springer Berlin Heidelberg; 2009.
40. Anand P, Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, et al. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceut Res.* 2008;25(9):2097-116.
41. Maier H, Sennewald E, Fischer G, Heller WD, Weidauer H. Chronic Alcohol Consumption-The Key Risk Factor for Pharyngeal Cancer. *Otolaryng Head Neck.* 1994;110(2):168-73.
42. Tuyns AJ. Epidemiology of Alcohol and Cancer. *Cancer Res.* 1979;39(7 Part 2):2840-3.
43. Doll R, Hill AB. Lung Cancer and Other Causes of Death in Relation to Smoking. *Brit Med J.* 1956;2(5001):1071-81.
44. Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P, et al. Tobacco smoking and cancer: A meta-analysis. *Int J Cancer.* 2008;122(1):155-64.
45. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults. *New Engl J Med.* 2003;348(17):1625-38.
46. Calle EE, Thun MJ. Obesity and cancer. *Oncogene.* 2004;23(38):6365-78.
47. Willett WC. Diet and Cancer. *Oncologist.* 2000;5(5):393-404.
48. Key TJ, Schatzkin A, Willett WC, Allen NE, Spencer EA, Travis RC. Diet, nutrition and the prevention of cancer. *Public Health Nutr.* 2004;7(1A; SPI):187-200.
49. Belpomme D, Irigaray P, Hardell L, Clapp R, Montagnier L, Epstein S, et al. The multitude and diversity of environmental carcinogens. *Environ Res.* 2007;105(3):414-29.
50. Cardis E, Vrijheid M, Blettner M, Gilbert E, Hakama M, Hill C, et al. Risk of cancer after low doses of ionising radiation: retrospective cohort study in 15 countries. *BMJ.* 2005;331(7508):77.

51. Patel P, Hanson DL, Sullivan PS, et al. Incidence of types of cancer among HIV-infected persons compared with the general population in the United States, 1992–2003. *Ann Intern Med.* 2008;148(10):728-36.
52. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002;55(4):244-65.
53. Blumberg BS, Larouzé B, London WT, Werner B, Hesser JE, Millman I, et al. The relation of infection with the hepatitis B agent to primary hepatic carcinoma. *Am J Pathol.* 1975;81(3):669-82.
54. King MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and Ovarian Cancer Risks Due to Inherited Mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science.* 2003;302(5645):643-6.
55. Bernstein L, Ross RK. Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiol Rev.* 1993;15(1):48-65.
56. Reiche EMV, Nunes SOV, Morimoto HK. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol.* 2004;5(10):617-25.
57. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2003;88(1):63-73.
58. Fonseca-Moutinho JA. Smoking and Cervical Cancer. *ISRN Obstet Gynecol.* 2011;2011:847684.
59. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical C. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16 573 women with cervical cancer and 35 509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet.* 370(9599):1609-21.
60. Kessler TA. Cervical Cancer: Prevention and Early Detection. *Semin Oncol Nurs.* 2017;33(2):172-83.
61. Lopez MS, Baker ES, Maza M, Fontes-Cintra G, Lopez A, Carvajal JM, et al. Cervical cancer prevention and treatment in Latin America. *J Surg Oncol.* 2017:n/a-n/a.

62. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(6):518-27.
63. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2003;89(1):101-5.
64. Lowy DR, Schiller JT. Reducing HPV-associated Cancer Globally. *Cancer Prev Res.* 2012;5(1):18-23.
65. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM Classification of malignant tumours. Geneva, Switzerland: John Wiley & Sons, Ltd; 2009.
66. Cervical Cancer. In: Schwab M, editor. *Encyclopedia of Cancer.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. p. 751-2.
67. Candelaria M, Garcia-Arias A, Cetina L, Dueñas-Gonzalez A. Radiosensitizers in cervical cancer. Cisplatin and beyond. *Radiat Oncol.* 2006;1:15-.
68. Choi IJ, Cha MS, Park ES, Han MS, Choi Y, Je GH, et al. The efficacy of concurrent cisplatin and 5-fluorouracil chemotherapy and radiation therapy for locally advanced cancer of the uterine cervix. *J Gynecol Oncol.* 2008;19(2):129-34.
69. Penson RT, Huang HQ, Wenzel LB, Monk BJ, Stockman S, Long lii HJ, et al. Bevacizumab for advanced cervical cancer: patient-reported outcomes of a randomised, phase 3 trial (NRG Oncology–Gynecologic Oncology Group protocol 240). *Lancet Oncol.* 2015;16(3):301-11.
70. Huang Z. A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy. *Technol Cancer Res Treat.* 2005;4(3):283-93.
71. Mayor PC, Lele S. Photodynamic Therapy in Gynecologic Malignancies: A Review of the Roswell Park Cancer Institute Experience. *Cancers.* 2016;8(10):88.
72. Kostron H. Photodynamic Diagnosis and Therapy for Brain Malignancies from the Bench to Clinical Application. In: Abdel-Kader MH, editor. *Photodynamic Therapy: Springer Berlin Heidelberg;* 2014. p. 165-84.

73. Pandey RK, Goswami LN, Chen Y, Gryshuk A, Missert JR, Oseroff A, et al. Nature: A rich source for developing multifunctional agents. tumor-imaging and photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.* 2006;38(5):445-67.
74. RL L, EJ B, AM O. Hematoporphyrin derivative: a new aid for endoscopic detection of malignant disease. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1961;42:623-9.
75. Gilaberte Y, Serra-Guillén C, de las Heras ME, Ruiz-Rodríguez R, Fernández-Lorente M, Benvenuto-Andrade C, et al. Terapia Fotodinámica en Dermatología. *Actas Dermosifiliogr.* 2006;97(2):83-102.
76. Rosenkranz AA, Jans DA, Sobolev AS. Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency. *Immunol Cell Biol.* 2000;78(4):452-64.
77. Morgan J, Jackson JD, Zheng X, Pandey SK, Pandey RK. Substrate affinity of photosensitizers derived from chlorophyll-a: The ABCG2 transporter affects the phototoxic response of side population stem cell-like cancer cells to photodynamic therapy. *Mol Pharm.* 2010;7(5):1789-804.
78. Lisart FF, Molina JP. Principios de la fototerapia y su aplicación en el paciente oncológico. *Farm Hosp.* 2004;2004(28/3):205.
79. Fong W-P, Yeung H-Y, Lo P-C, Ng DP. Photodynamic Therapy. In: Ho AHP, Kim D, Somekh MG, editors. *Handbook of Photonics for Biomedical Engineering*: Springer Netherlands; 2014. p. 1-20.
80. Moghissi K, Allison R. Photodynamic Therapy for Thoracic Oncology. In: Abdel-Kader MH, editor. *Photodynamic Therapy*: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 185-212.
81. Allison R, Moghissi K, Downie G, Dixon K. Photodynamic therapy (PDT) for lung cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 8(3):231-9.
82. Josefsen LB, Boyle RW. Photodynamic Therapy and the Development of Metal-Based Photosensitisers. *Met Based Drugs.* 2008;2008:276109.
83. Smith K, Malatesti N, Cauchon N, Hunting D, Lecomte R, van Lier JE, et al. Mono- and tri-cationic porphyrin–monoclonal antibody conjugates: photodynamic activity and mechanism of action. *Immunology.* 2011;132(2):256-65.

84. Pandey RK, Goswami LN, Chen Y, Gryshuk A, Missert JR, Oseroff A, et al. Nature: A rich source for developing multifunctional agents. tumor-imaging and photodynamic therapy. *Laser Surg Med.* 2006;38(5):445-67.
85. Karunakaran SC, Babu PSS, Madhuri B, Marydasan B, Paul AK, Nair AS, et al. In Vitro Demonstration of Apoptosis Mediated Photodynamic Activity and NIR Nucleus Imaging through a Novel Porphyrin. *ACS Chem Biol.* 2013;8(1):127-32.
86. Chaleix V, Sol V, Huang Y-M, Guilloton M, Granet R, Blais Jean C, et al. RGD-Porphyrin Conjugates: Synthesis and Potential Application in Photodynamic Therapy. *Eur J Org Chem.* 2003;2003(8):1486-93.
87. Nwogu C, Pera P, Bshara W, Attwood K, Pandey R. Photodynamic therapy of human lung cancer xenografts in mice. *J Surg Res.*
88. Malatesti N, Harej A, Kraljević-Pavelić S, Lončarić M, Zorc H, Wittine K, et al. Synthesis, characterisation and in vitro investigation of photodynamic activity of 5-(4-octadecanamidophenyl)-10,15,20-tris(N-methylpyridinium-3-yl)porphyrin trichloride on HeLa cells using low light fluence rate. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 15:115-26.
89. Acedo P, Stockert JC, Cañete M, Villanueva A. Two combined photosensitizers: a goal for more effective photodynamic therapy of cancer. *Cell Death Dis.* 2014;5(3):e1122.
90. Hopkins SL, Siewert B, Askes SHC, Veldhuizen P, Zwier R, Heger M, et al. An in vitro cell irradiation protocol for testing photopharmaceuticals and the effect of blue, green, and red light on human cancer cell lines. *Photochem Photobiol Sci.* 2016;15(5):644-53.
91. Smith KM. *Porphyryns and Metalloporphyryns: A New Edition Based on the Original Volume by J. E. Falk*: Elsevier; 1975.
92. Di L, Kerns EH. *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization*: Academic Press; 2008.
93. Thomas G. *Medicinal Chemistry: An Introduction*: Wiley; 2007.
94. Thomas G. *Fundamentals of Medicinal Chemistry*: Wiley; 2004.
95. Silverman RB. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*: Elsevier Science; 2012.

96. Kalgutkar AS, Dalvie D, Obach RS, Smith DA, Mannhold R, Kubinyi H, et al. *Reactive Drug Metabolites*: Wiley; 2012.
97. Colacci A, Arfellini G, Mazzullo M, Prodi G, Grilli S. The Covalent Binding of Bromobenzene with Nucleic Acids. *Toxicol Pathol.* 1985;13(4):276-82.