



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**SÍNTESIS DE COMPLEJOS DE RUTENIO CON LIGANTES DERIVADOS DE LA
PROTOPORFIRINA-IX Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. ANDRÉS CAMILO RESTREPO ACEVEDO

**DR. RONAN LE LAGADEC
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

CIUDAD DE MÉXICO, ABRIL 2025



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**SÍNTESIS DE COMPLEJOS DE RUTENIO CON LIGANTES
DERIVADOS DE LA PROTOPORFIRINA-IX Y EVALUACIÓN DE SU
ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. ANDRÉS CAMILO RESTREPO ACEVEDO

**DR. RONAN LE LAGADEC
CIUDAD DE MÉXICO, ABRIL 2025**



Ciudad de México, Abril de 2025

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dra. Noráh Yolanda Barba Behrens

Vocal: Dr. René Miranda Ruvalcaba

Vocal: Dr. Víctor Barba López

Vocal: Dr. Marcos Hernández Rodríguez

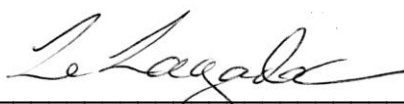
Secretario: Dra. Susana Porcel García

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA DE INVESTIGACIÓN:

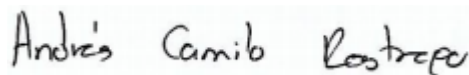
Laboratorio de Química Inorgánica 2

Instituto De Química

Universidad Nacional Autónoma de México



Tutor: Dr. Ronan Le Lagadec



Alumno: M. en C. Andrés Camilo Restrepo Acevedo

DEDICATORIAS

A Dios por bendecirme, haberme dado la salud, ánimo y sabiduría para lograr mis objetivos y por protegerme durante este camino para superar los obstáculos y dificultades lejos de mi familia y de mi tierra.

*A mi abuela **Gloria Amparo Restrepo** por todo el amor que me brinda, por las llamadas cada día que paso lejos de ella solo para decirme “hola”, a ella infinitas gracias por ser la persona más importante y por ser el motor de mi vida.*

*A mi padre **Victor Hugo Restrepo** por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan, por apoyarme en todo momento, él se merece esto y mucho más.*

*A mi madre **Martha Viviana Acevedo** por el amor que me da. Gracias, mamá por haberme dado la vida.*

*A mi tío **Ariel Antonio Salazar Restrepo** porque es como un padre, porque a lo largo de mi vida ha velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo incondicional en todo momento.*

*A mis hermanos **Heidy Daniela Restrepo, Santiago Restrepo, Sebastian Restrepo, Thiago Restrepo**, a mi prima hermana **Andrea Jhoana Salazar** y a mi sobrinita **Gabriela García Restrepo** que con su amor me han ayudado a salir adelante, gracias por preocuparse por mí todo este tiempo, pero, sobre todo, gracias por compartir sus vidas conmigo.*

*A **Hernando Restrepo, Edwuard Restrepo y Edelmira Agudelo** por ser parte de mi vida y apoyarme siempre.*

“Si aprendes a usar lo que tienes, no necesitaras lo que no tienes”

Dr. Dolittle

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por tener el mejor programa de química, gracias al **Instituto de Química** por brindar todos los elementos necesarios para desarrollar excelentes trabajos de investigación.

Al CONAHCYT por la beca otorgada (No. CVU: 996154) y el apoyo financiero (Proyecto A1-S-15068)

Al apoyo financiero de la **DGAPA - UNAM** (Proyectos PAPIIT IN-211522 y IN207725), al programa de **Actividades Académicas Nacionales o Internacionales de Larga Duración** de la Coordinación General de Estudios de Posgrado de la UNAM, y a **ECOS Nord** (Proyecto 279063).

A mi novia y amiga **Loren Dayana Largo** por haber estado durante este proceso a mi lado, por haber estado pendiente de mí, por apoyarme en todo momento y por ser una de las personas más especiales para mí.

A mis compañeros de laboratorio IN2 del Instituto de Química, y amigos especialmente a **María Isabel Murillo, Elkin Alexis Sánchez, Manuel Alejandro Roque, Carlos Felipe Mejía, Víctor Manuel Correal, Lucas Verget y Sebastián Oviedo** por el apoyo que recibí de ellos durante esta etapa.

A los doctores **Georg Mellitzer y Christian Gaidon** por haberme permitido tener una experiencia tan enriquecedora al haber trabajado bajo su dirección durante mi estancia en Francia y a su equipo de trabajo **Chloé Thibaudeau, Sevda Recberlik, Mingyi Wu, Christophe Orvain, Nathalie Perrusson, Veronique Devignot y Cyril Bour** por haberme tenido paciencia y por haberme hecho sentir como en casa.

Al Dr. Rubén Toscano y Marcos Flores por los estudios cristalográficos por difracción de rayos X y a todos los técnicos académicos del instituto de química, en especial a **María de la Paz Orta Pérez** y a la maestra **Virginia Gómez Vidales**, por todo el apoyo que me brindaron durante este tiempo y por su amistad.

Al profesor y amigo **Fernando Cuenú Cabezas** ya que gracias a sus consejos durante la licenciatura hoy estoy donde estoy.

A mi comité tutor, la **Dra. Norah Barba** y el **Dr. Iván Castillo Pérez** por sus consejos y observaciones a lo largo de esta investigación.

Por último, a mi director y amigo **Dr. Ronan Le Lagadec** por abrirme las puertas de su laboratorio, por haber confiado en mí, por su apoyo y por toda la paciencia que me tuvo durante estos años, a usted **Dr. Ronan** infinitas gracias por absolutamente todo.

RESUMEN

Los fármacos a base de platino son ampliamente empleados para el tratamiento de varios tipos de cáncer mediante la quimioterapia. Sin embargo, la utilización de estos fármacos es de uso limitado ya que las células cancerosas adquieren resistencia, lo cual implica que la dosis del fármaco a base de platino se tiene que incrementar. Una de las consecuencias al incrementar la dosis de los fármacos es que se producen efectos secundarios severos sobre el paciente como, neurotoxicidad, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, pueden causar la muerte. Es por esta razón que muchos investigadores intentan reemplazar los fármacos a base de platino por otro metal de transición. Entre los metales de transición investigados, los complejos a base de rutenio han atraído un creciente interés ya que varios complejos de rutenio han entrado a ensayos clínicos. Es por ello, que el propósito del presente estudio fue evaluar la citotoxicidad de derivados de porfirinas y clorinas y nuevos compuestos de rutenio en células de cáncer gástrico AGS antes y después de ser irradiados con luz visible, los cuales podrían proporcionar nuevas alternativas terapéuticas a las del platino. Los resultados preliminares obtenidos sobre el comportamiento anticanceroso de los compuestos estudiados en esta investigación los convierten en excelentes candidatos para ser usados como posibles fotosensibilizadores en la terapia fotodinámica.

ABSTRACT

Platinum-based drugs are widely used for the treatment of various types of cancer by chemotherapy. However, the use of these drugs is of limited use because cancer cells acquire resistance, which means that the dose of the platinum-based drug has to be increased. One of the consequences of increasing the dose of the drugs is that severe side effects occur in the patient, such as neurotoxicity, hepatotoxicity, nephrotoxicity, and may cause death. It is for this reason that many researchers are trying to replace platinum-based drugs with another transition metal. Among the transition metals investigated, ruthenium-based complexes have attracted increasing interest as several ruthenium complexes have entered clinical trials. Therefore, the purpose of the present study was to evaluate the cytotoxicity of porphyrin and chlorine derivatives and new ruthenium compounds on AGS gastric cancer cells before and after irradiation with visible light, which could provide new therapeutic alternatives to platinum. The preliminary results obtained on the anticancer behavior of the compounds studied in this research make them excellent candidates for use as potential photosensitizers in photodynamic therapy.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	14
2.1 Cáncer	14
2.1.1 Diferencia entre una célula sana y una cancerosa	15
2.1.2 Desarrollo del cáncer	15
2.1.3. Tratamientos para el cáncer	16
2.2 Tetrapirroles	28
2.3 Metaloporfirinas	32
2.4 El rutenio en la terapia contra el cáncer	35
3. HIPÓTESIS	38
4. OBJETIVOS	39
4.1. Objetivo general	39
4.2. Objetivos específicos	39
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
5.1 Síntesis y caracterización	40
5.2 Absorción electrónica	56
5.3 Pruebas de estabilidad	58
5.4 Pruebas de fotoestabilidad	61
5.5 Lipofilicidad	64
5.6 Rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_f)	65
5.7 Rendimiento cuántico de oxígeno singulete (Φ_Δ)	67
5.8 Determinación de especies reactivas de oxígeno por EPR	72
5.9 Evaluación de la citotoxicidad	81
5.10 Influencia de la producción de $^1\text{O}_2$ sobre la actividad citotóxica	84
5.11 Posibles vías de acción	85
6. CONCLUSIONES	91
7. SECCIÓN EXPERIMENTAL	92
7.1 Reactivos	92
7.2 Disolventes	92
7.3 Equipos	92
7.4 Síntesis de compuestos orgánicos	93
7.4.1 Síntesis del compuesto dMePpIX	93
7.4.2 Síntesis del compuesto dBnPpIX	94
7.4.3 Síntesis de clorinas	94
7.5 Síntesis de complejos de rutenio	96
7.6 Cristalografía	98
7.7 Estudios de espectrofotometría Uv-Vis	98
7.8 Estudios de estabilidad	98
7.9 Estudios de fotoestabilidad	98
7.10 Estudios de lipofilicidad	99
7.11 Mediciones del rendimiento cuántico de fluorescencia	99
7.12 Mediciones del rendimiento cuántico de oxígeno singulete	99
7.13 Determinación de las especies reactivas de oxígeno mediante EPR	100
7.13.1 Determinación de oxígeno singulete	100
7.13.2 Determinación de radical superóxido	100
7.14 Línea celular	100

7.15 Evaluación de la citotoxicidad	101
7.16 Ensayos por Western blot.....	101
8. Referencias	102
9. Publicación y conferencias	117
10. Anexos	118

LISTA DE ANEXOS

A lo largo de esta presentación se emplean algunos acrónimos en inglés que, aunque pueden considerarse barbarismos, se han mantenido debido a su uso extendido en la literatura especializada.

Anexo 1. Espectro RMN- ¹ H de dMePpIX en CDCl ₃ , 300 MHz.	118
Anexo 2. Espectro RMN- ¹³ C de dMePpIX en CDCl ₃ , 75 MHz.	118
Anexo 3. Espectro FT-IR de dMePpIX	119
Anexo 4. Espectro MS-FAB ⁺ de dMePpIX	119
Anexo 5. Espectro RMN- ¹³ C de dBnPpIX en CDCl ₃ , 75 MHz.	120
Anexo 6. Espectro FT-IR de dBnPpIX	120
Anexo 7. Espectro MS-FAB ⁺ de dBnPpIX	121
Anexo 8. Espectro RMN- ¹³ C de dMeCloAB en CDCl ₃ , 75 MHz.	122
Anexo 9. Espectro MS-ESI de dMeCloAB	122
Anexo 10. Espectro RMN- ¹ H de dMeCloA en CDCl ₃ , 300 MHz.	123
Anexo 11. Espectro RMN- ¹³ C de dMeCloA en CDCl ₃ , 75 MHz.	123
Anexo 12. Espectro FT-IR de dMeCloA	124
Anexo 13. Espectro MS-ESI de dMeCloA	124
Anexo 14. Espectro RMN- ¹ H de dMeCloB en CDCl ₃ , 300 MHz.	125
Anexo 15. Espectro RMN- ¹³ C de dMeCloB en CDCl ₃ , 75 MHz.	125
Anexo 16. Espectro FT-IR de dMeCloB	126
Anexo 17. Espectro MS-ESI de dMeCloB	126
Anexo 18. Espectro RMN- ¹ H de dBnCloAB en CDCl ₃ , 300 MHz.	127
Anexo 19. Espectro RMN- ¹ H de dBnCloA en CDCl ₃ , 300 MHz.	127
Anexo 20. Espectro RMN- ¹³ C de dBnCloA en CDCl ₃ , 75 MHz.	128
Anexo 21. Espectro FT-IR de dMeCloA	128
Anexo 22. Espectro MS-ESI de dBnCloA	129
Anexo 23. Espectro RMN- ¹ H de dBnCloB en CDCl ₃ , 300 MHz.	129
Anexo 24. Espectro RMN- ¹³ C de dBnCloB en CDCl ₃ , 75 MHz.	130
Anexo 25. Espectro FT-IR de dMeCloB	130
Anexo 26. Espectro MS-ESI de dBnCloB	131
Anexo 27. Espectro RMN- ¹³ C de [Ru(dMePpIX)CO] en CD ₃ CN, 125 MHz.	131
Anexo 28. Espectro MS-FAB ⁺ de [Ru(dMePpIX)CO]	132
Anexo 29. Espectro RMN- ¹ H de [Ru(dBnPpIX)CO] en CD ₃ CN, 500 MHz.	132
Anexo 30. Espectro RMN- ¹³ C de [Ru(dBnPpIX)CO] en CD ₃ CN, 125 MHz.	133
Anexo 31. Espectro MS-ESI de [Ru(dBnPpIX)CO]	133
Anexo 32. Espectro RMN- ¹ H de [Ru(dMeCloAB)CO] en acetona- <i>d</i> ₆ , 300 MHz.	134
Anexo 33. Espectro RMN- ¹³ C de [Ru(dMeCloAB)CO] en acetona- <i>d</i> ₆ , 75 MHz.	134
Anexo 34. Espectro MS-ESI de [Ru(dMeCloAB)CO]	135
Anexo 35. Espectro RMN- ¹ H de [Ru(dMeCloA)CO] en acetona- <i>d</i> ₆ , 300 MHz.	135
Anexo 36. Espectro RMN- ¹³ C de [Ru(dMeCloA)CO] en acetona- <i>d</i> ₆ , 75 MHz.	136
Anexo 37. Espectro MS-ESI de [Ru(dMeCloA)CO]	136
Anexo 38. Espectro RMN- ¹ H de [Ru(dMeCloB)CO] en acetona- <i>d</i> ₆ , 300 MHz.	137
Anexo 39. Espectro RMN- ¹³ C de [Ru(dMeCloB)CO] en acetona- <i>d</i> ₆ , 75 MHz.	137
Anexo 40. Espectro MS-ESI de [Ru(dMeCloB)CO]	138
Anexo 41. HPLC de dMePpIX . Detección a 406 nm.	139
Anexo 42. HPLC de dBnPpIX . Detección a 408 nm.	139

Anexo 43. HPLC de dBnCloAB . Detección a 406 nm.	140
Anexo 44. HPLC de dBnCloA . Detección a 406 nm.	140
Anexo 45. HPLC de dBnCloB . Detección a 408 nm.	141
Anexo 46. HPLC de [Ru(dMePpIX)CO] . Detección a 404 nm.	141
Anexo 47. HPLC de [Ru(dBnPpIX)CO] . Detección a 402 nm.	142
Anexo 48. HPLC de [Ru(dMeCloAB)CO] . Detección a 402 nm.	142
Anexo 49. HPLC de [Ru(dMeCloA)CO] . Detección a 408 nm.	143
Anexo 50. HPLC de [Ru(dMeCloB)CO] . Detección a 402 nm.	143
Anexo 51. FT-IR de [Ru(dMePpIX)CO]	144
Anexo 52. FT-IR de [Ru(dBnPpIX)CO]	144
Anexo 53. FT-IR de [Ru(dMeCloAB)CO]	145
Anexo 54. FT-IR de [Ru(dMeCloA)CO]	145
Anexo 55. FT-IR de [Ru(dMeCloB)CO]	146

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN Ácido desoxirribonucleico
AGS Adenocarcinoma gástrico humano
ALA Ácido 5-aminolevulínico
BCC Carcinoma de células basales
BSA Albumina sérica bovina
d doblete
DBB 1,2-Dibenzoilbenceno
DMAD Acetilendicarboxilato de dimetilo
DMPO 5,5-Dimetil-1-pirrolina-*N*-óxido
DPBF 1,3-Difenilbenzofurano
DSSC Celdas solares sensibilizadas por colorantes
EPR Resonancia paramagnética electrónica
MS-ESI Espectrometría de masas por Ionización Electrospray
MS-FAB⁺ Espectrometría de masas con bombardeo con átomos rápidos en modo positivo
FBS Suero bovino fetal
FDA Food and drug administration
g Factor g o factor de Landé.
hfcc Constante de acoplamiento hiperfino
HPLC Cromatografía líquida de alto rendimiento
Hz Hertz
IC₅₀ Concentración inhibidora media de 50%
IR-ATR: Infrarrojo reflexión total atenuada (Infrared-Attenuated Total Reflection)
ISC Cruce entre sistemas
J Constante de acoplamiento
K_{ps} Constante de descomposición del PS
K_{ref} Constante de descomposición de la referencia
logP Coeficiente de partición
m Multiplete
MAL Metil 5-aminolevulinato
mM Milimolar
mT Militesla

MTT 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
n.d. No detectado
NIR Infrarrojo cercano
NOE Efecto nuclear Overhauser
NOESY Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy
OMS Organización mundial de la salud
PBS Solución salina tamponada con fosfatos
PBST Solución salina tamponada con fosfatos y tween-20
PDT Terapia fotodinámica
PI Índice de fototoxicidad
PpIX Protoporfirina IX
ppm Partes por millón
¹PS* PS en su estado singulete excitado
PS Fotosensibilizador
PSo PS en su estado electrónico basal
RE Retículo endoplásmico
R_f Factor de retención
RMN-¹³C Resonancia magnética nuclear de carbono-13
RMN-¹H Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
ROS Especies reactivas de oxígeno
s Singulete
SOC Acoplamiento spin – órbita
t Triplete
TBST Solución salina tamponada con tris y tween-20
TEMP 2,2,6,6-Tetrametilpiperidina
TEMPO 2,2,6,6-Tetrametil-1-piperidiniloxi
TLC Cromatografía en capa fina
TMS Tetrametilsilano
VP Verteporfina
λ_{em} Longitud de onda de emisión
λ_{ex} Longitud de onda de excitación
Φ_f Rendimiento cuántico de fluorescencia
Φ_A Rendimiento cuántico de fluorescencia

1. INTRODUCCIÓN

Se sabe que el cáncer es una de las enfermedades que más muertes causa a nivel mundial.¹ En la actualidad, el incremento del número de pacientes con cáncer se asocia a factores ambientales, como la radiación, la contaminación, la exposición a diversos químicos e incluso por los malos hábitos de alimentación, es decir la poca ingesta de frutas y verduras. El cáncer es una enfermedad difícil de tratar ya que existen más de 100 tipos de cánceres donde todos se caracterizan por el crecimiento incontrolado de células, causado por una alteración en el ADN, donde las células se dividen rápidamente y se acumulan dando lugar a la formación de una masa celular, también llamada tumor dentro del órgano afectado.^{2,3} Cada tipo de cáncer requiere de un tratamiento específico. Dentro de los tratamientos más utilizados para combatir el cáncer tenemos la cirugía, la quimioterapia, la radiación, la terapia hormonal, la inmunoterapia, trasplante de células madre, terapia dirigida, la terapia fotodinámica (PDT), entre otros.

El tratamiento más empleado para tratar el cáncer es la quimioterapia la cual se basada en el uso de medicamentos citotóxicos antineoplásicos o quimioterápicos. Los medicamentos quimioterapéuticos más empleados para destruir las células cancerosas son derivados del platino. Su único modo de acción es a través de interacciones con el ADN nuclear, formando enlaces (Pt-ADN) y dando lugar a daños en el ADN que llevan a la muerte celular apoptótica.⁴ El mayor problema de estos medicamentos es que pueden causar múltiples efectos secundarios graves ya que no distinguen entre células sanas de rápido crecimiento y células cancerosas.⁵

La PDT emerge como un tratamiento no invasivo y altamente selectivo para tratar enfermedades neoplásicas y no malignas, alternativo a la quimioterapia implicando la utilización de la luz. La PDT combina tres componentes claves: un fotosensibilizador (PS), luz y oxígeno para producir especies reactivas de oxígeno (ROS).⁶⁻⁸ Cuando el PS es excitado por la luz, se pueden producir dos tipos de reacciones, que se denominan reacciones de tipo I y tipo II. En las reacciones de tipo I, el PS en su estado triplete excitado reacciona con biomoléculas presentes en el medio (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos), transfiriendo átomos de hidrógeno y genera radicales que luego reaccionan con el oxígeno, lo que da como resultado la generación de ROS como anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroperóxido ($HOO^{\cdot}$), peróxidos (H_2O_2 , $ROOH$) y radical hidroxilo ($HO^{\cdot}$) los cuales pueden inducir procesos que llevan a la muerte celular.^{9,10} En la reacción de tipo II se producen elevadas cantidades de oxígeno singulete (1O_2), el cual es extremadamente tóxico y provoca daños oxidativos en las células, lo que resulta en su destrucción.¹¹

Las ROS y el oxígeno singulete formados durante la PDT son altamente reactivos y presentan una vida media de corta duración. Debido a esto, la PDT afecta directamente solo la región donde se generan estas especies y dentro de un radio de 20 nanómetros.¹²

Muchos PS son basados en la estructura de la porfirina, como las clorinas, benzoporfirinas, purpurinas, texafirinas, ftalocianinas, naftalocianinas y varios fotosensibilizadores derivados de porfirinas son de uso clínico. Por ejemplo, photofrin, visudina (VP) y la protoporfirina IX (PpIX) presentan una excelente selectividad de acumulación en el tejido tumoral^{12,13} y altos rendimientos cuánticos de formación de oxígeno singulete.¹⁴

En adición, se ha observado que metaloclorinas de Pd(II) también son excelentes PS en la PDT, como se ha observado en TOOKAD[®] (Figura 1), que es una clorina de paladio, aprobada en varios países de la UE, Israel y México para su uso como PS en la PDT para el tratamiento del cáncer post-renal.¹⁵ Asimismo, complejos derivados de Ru(II) se encuentran entre los sistemas más estudiados por sus propiedades fotoquímicas, fotofísicas y, más recientemente, fotobiológicas. En este sentido, TLD1433 (Figura 1), es el primer PS basado en Ru que ha entrado en un ensayo clínico de fase II para el tratamiento del cáncer de vejiga no invasivo.¹⁶

Por lo tanto, inspirados por las propiedades fotoquímicas de las porfirinas y las clorinas decidimos utilizarlas como ligantes para formar nuevas metaloporfirinas o metaloclorinas de rutenio(II). Las porfirinas, clorinas y las nuevas metaloporfirinas y metaloclorinas sintetizadas en esta investigación se utilizarán como PS en la PDT utilizando células de cáncer gástrico AGS.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

El cáncer es una de las enfermedades que más afecta a la población. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2022 se diagnosticaron aproximadamente 20 millones de personas con esta enfermedad y ocupó la segunda causa principal de muertes a nivel mundial (después de las enfermedades cardiovasculares) dejando aproximadamente 9.7 millones de defunciones. Alrededor de un tercio de las muertes por cáncer ocurrió en personas con malos hábitos de vida como: alto índice de masa corporal, baja ingesta de frutas y verduras, sedentarismo y el consumo abusivo de alcohol y tabaco.¹⁷

El incremento de pacientes con cáncer es de gran preocupación ya que tan solo en el año 2022, el cáncer de pulmón fue la principal causa de muerte por cáncer (1.8 millones de muertes, que representan el 18.7% del total de muertes por cáncer), seguido del cáncer colorrectal (900.000 muertes; 9.3%), el cáncer de hígado (760.000 muertes; 7.8%), el cáncer de mama (670.000 muertes; 6.9%) y el cáncer de estómago (660.000 muertes; 6.8%).¹⁷

En México, en el año 2023 las muertes por cáncer ocuparon el tercer lugar (después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes) siendo los tipos de cáncer más comunes y que más decesos causan: pulmón, mama, colon y próstata dejando alrededor de 50.000 personas diagnosticadas con algún tipo de cáncer.¹⁸

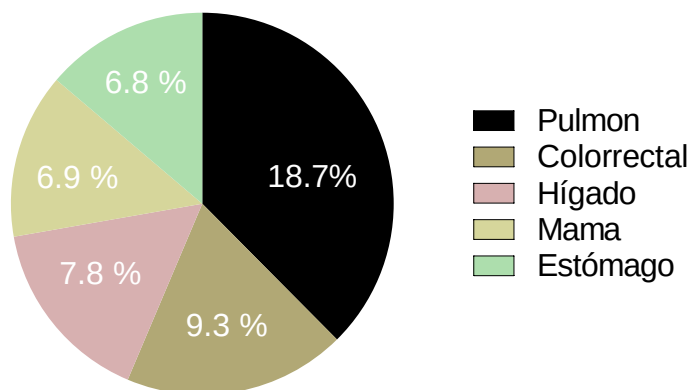


Figura 1. Representación gráfica de los principales tipos de cáncer en el año 2022 a nivel mundial.¹⁷

Existen dos tipos de tumores que pueden ser: cancerosos (malignos) o no cancerosos (benignos). Los tumores malignos pueden extenderse a tejidos sanos a su alrededor. Además, algunas células cancerosas madres se pueden desprender del tumor original y diseminarse a diferentes partes del cuerpo por medio del sistema circulatorio o el sistema linfático formando nuevos tumores. Este proceso es conocido como metástasis. Por otra parte, los tumores benignos no se extienden ni invaden tejidos cercanos.¹⁹

2.1.1 Diferencia entre una célula sana y una cancerosa

A diferencia de las células sanas; las células tumorales necesitan más nutrientes para su desarrollo. Es por ello por lo que las células cancerosas pueden indicar a los vasos sanguíneos que crezcan hacia los tumores. Estos vasos sanguíneos suministran oxígeno y nutrientes a los tumores y eliminan los productos de desecho. Además, pueden engañar al sistema inmunitario para que ayude a las células cancerosas a mantenerse vivas y crecer (por ejemplo, algunas células cancerosas convencen a las células inmunitarias de proteger el tumor en lugar de atacarlo).²⁰⁻²² En muchos casos, las células cancerosas dependen de estas mutaciones y no podrían sobrevivir sin ellos.

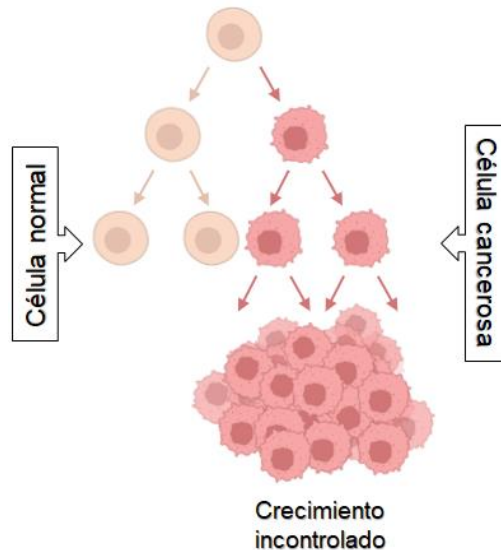


Figura 2. Diferencia en la división celular entre una célula sana y una célula cancerosa.

2.1.2 Desarrollo del cáncer

Generalmente, el desarrollo del cáncer consta de 4 etapas:²³

- **Etapa I:** Lo primero que ocurre en esta fase son los cambios celulares que dotan a las células de las características de malignidad, es decir, de multiplicación descontrolada y capacidad de invasión. Es la etapa más larga de la enfermedad, no es diagnosticable ni produce sintomatología. Esta fase puede durar hasta 30 años.
- **Etapa II:** Se caracteriza por la existencia de la lesión cancerosa microscópica localizada en el tejido donde se ha originado. En los adultos suele durar entre 5 y 10 años, dependiendo del tipo de cáncer. En esta fase, tampoco aparecen síntomas o molestias. En determinados casos como en el cáncer de mama, cuello uterino o colon, la enfermedad se puede diagnosticar en esta fase.

- **Etapa III:** Posteriormente, la lesión comienza a extenderse fuera de su localización de origen e invade tejidos u órganos adyacentes (invasión local). En la edad adulta dura entre 1 y 5 años. En esta fase, la aparición de síntomas de la enfermedad depende del tipo de cáncer, de su crecimiento y de su localización.
- **2.3.4. Etapa IV:** Finalmente, la enfermedad se disemina fuera de su lugar de origen, apareciendo nuevas lesiones tumorales en otros órganos denominadas metástasis (invasión a distancia). La sintomatología que presenta el paciente suele ser compleja. Depende del tipo de tumor, de la localización y extensión de las metástasis. Esta es la etapa terminal del paciente.



Figura 3. Etapas del desarrollo del cáncer (cáncer de mama).

2.1.3. Tratamientos para el cáncer

El cáncer es una enfermedad que es difícil de tratar debido a que puede afectar a una gran variedad de células y órganos en el cuerpo como se mencionó anteriormente. Sin embargo, un diagnóstico temprano de cáncer es esencial para el tratamiento.

En la actualidad existen una gran variedad de tratamientos para combatir esta enfermedad; los más comunes son:

Cirugía: Consiste en extirpar el tumor. Hay dos tipos: la cirugía abierta, que consiste en realizar un corte grande con el fin de extraer el tumor y parte del tejido sano que se encuentre alrededor de este. Y la cirugía invasiva que consiste en realizar pequeños cortes donde está localizado el tumor, introducir un tubo largo con una cámara llamado laparoscópio el cual proyecta imágenes del interior del cuerpo a una pantalla, permitiendo que el cirujano vea lo que está haciendo y de esta manera extraer el tumor y parte del tejido sano que lo rodea. Actualmente se está estudiando la criocirugía, la cual es un tipo de cirugía que utiliza una criosonda con nitrógeno o argón líquido para destruir el tejido anormal. La desventaja de la cirugía (independientemente del tipo) es que no puede tratar el cáncer que se ha diseminado o el cáncer que está en la sangre, como la leucemia.^{24,25}

Radioterapia: También llamada terapia de radiación, es un tratamiento que implementa dosis de radiación (rayos X o gama) para destruir las células

cancerosas y reducir el tamaño del tumor. Hay dos tipos de radioterapia que son: de haz externo o local. Y consiste en enviar la radiación a una parte específica del cuerpo. Y el otro tipo llamado radioterapia de haz interno o braquiterapia, que es un tratamiento donde se colocan semillas, listones o cápsulas (pequeños implantes radiactivos) dentro del cuerpo (directamente en el tumor o cerca de este), una vez introducida la fuente de radiación en el cuerpo. Finalmente, la radiación mata las células cancerosas.^{24,26}

Inmunoterapia: Es un tratamiento que utiliza el propio sistema inmunitario del paciente para combatir el cáncer. La inmunoterapia puede reforzar o cambiar el funcionamiento del sistema inmunitario para ayudarlo a encontrar y atacar las células cancerosas.^{24,27}

Además, en las últimas décadas han surgido otros tipos de tratamientos que derivan de la inmunoterapia como:

Inhibidores del punto de control inmunitario: Son medicamentos esferoidales (rednisona, metilprednisolona, dexametasona), colchicina, sulfasalazina, entre otros, que funcionan al bloquear ciertas proteínas presentes en las células cancerosas, ayudando así que las células T (células inmunitarias) puedan atacar y destruir las células cancerosas.²⁸

Vacunas: Provocan que el sistema inmunitario ataque las células con uno o más antígenos específicos. Debido a que el sistema inmunitario tiene células de memoria (memoria inmunológica) especiales. Se espera que la vacuna pueda seguir funcionando mucho después de que se administra.²⁹

Anticuerpos monoclonales: Son medicamentos que funcionan como anticuerpos naturales. Marcan las células cancerosas como las que el sistema inmunitario debería atacar.³⁰

Terapia dirigida: Es un tipo de tratamiento que usa medicamentos u otras sustancias para identificar y atacar con precisión ciertos tipos de células cancerosas. Estos generalmente se combinan con otros tratamientos. Son medicamentos fuertes, como en la quimioterapia, pero en lugar de matar todas las células de crecimiento rápido, se concentran en las partes de las células cancerosas que las diferencian de otras células. Los medicamentos dirigidos pueden detener el crecimiento de los vasos sanguíneos alrededor de las células cancerosas o apagar las señales que indican que las células cancerosas crezcan y de esta manera bloquear el desarrollo del tumor.^{24,31}

Trasplante de células madre: También llamado trasplante de médula ósea es un tratamiento que se puede utilizar para tratar ciertos tipos de cáncer como: leucemia, mieloma múltiple, o algunos tipos de linfoma. Los trasplantes de células madre ayudan a las personas a restaurar las células madre destruidas por las dosis altas de quimioterapia o radioterapia.^{24,32}

Terapia hormonal: También llamada terapia endocrina, se dirige a los cánceres que usan hormonas para crecer (cáncer de mama, próstata, endometrio y

suprarrenal). Hay dos tipos de terapia: una que le impide al cáncer producir hormonas y otra que evita que las hormonas funcionen como deberían, la terapia hormonal se puede administrar al paciente en forma oral o inyectada. Además, en ocasiones, puede someterse el paciente a una cirugía para extraer los órganos que produce hormonas, como ovarios en las mujeres y testículos en los hombres. Los médicos usan la terapia hormonal con otros métodos para reducir el tamaño de los tumores antes de la cirugía o el tratamiento, o para eliminar las células cancerosas que se han diseminado a otras partes del cuerpo. También puede reducir las posibilidades de que el cáncer regrese.^{24,33}

Quimioterapia: Está basada en el uso de medicamentos denominados antineoplásicos o quimioterápicos, los cuales son citotóxicos. El gran problema de estos medicamentos es que pueden causar efectos secundarios graves ya que, matan las células de rápido crecimiento sin importar que sean malignas o benignas, incluidas las de la sangre, la boca, el sistema digestivo y los folículos capilares. Estos fármacos presentan una baja selectividad para el tejido canceroso sobre el tejido normal. Hay más de 100 tipos de medicamentos quimioterápicos.³⁴ Los fármacos antineoplásicos a base de platino se encuentran entre los agentes anticancerosos más importantes y se utilizan con éxito en una amplia gama de tumores malignos en humanos, como agentes únicos o en combinación con otros medicamentos. Se usan para el tratamiento de varios tipos de cáncer como: cáncer de mama, cáncer de colon, testicular, ovario, vejiga, gástrico y pulmón. Alrededor de un 50% de los pacientes diagnosticados con cáncer y que reciben la quimioterapia usan algún medicamento a base de platino y el otro 50% usan medicamentos orgánicos.³⁵

A partir del platino, se sintetizó el compuesto *cis*-diaminocloroplatino(II) más conocido como cisplatino, el cual ha sido la base de la familia de fármacos que contienen platino y son utilizados ampliamente en la actualidad en terapias contra el cáncer. Fue descrito por primera vez por el químico italiano Michele Peyrone en 1845, y conocido como sal de Peyrone.³⁶ La estructura fue descubierta por el químico suizo Alfred Werner en el año 1893.³⁷ En el año 1960, Barnett Rosenberg descubrió que la electrólisis de un electrodo de platino en una disolución amortiguadora de cloruro de amonio producía cisplatino, cuando realizaba estudios sobre la inhibición de la fisión bacteriana de *Escherichia coli* en la Universidad Estatal de Michigan. Rosenberg observó que la bacteria alcanzaba hasta 300 veces su tamaño normal pero la división celular no se llevaba a cabo, por lo tanto, inicio la realización de una serie de experimentos para comprobar que los efectos eran propios de los productos generados por la electrólisis de platino. Este estudio llevó al descubrimiento de la actividad antitumoral del cisplatino.^{38,39}

El cisplatino se administró por primera vez a un paciente con cáncer en el año 1971. A partir de 1978, el cisplatino estuvo disponible para la práctica de oncología (especialidad médica que estudia y trata de enfermedades tumorales). Así mismo, en el año 1978 fue aprobado en Canadá y poco después por la FDA (Food and Drug Administration) en los Estados Unidos, seguido finalmente por el resto del mundo para el tratamiento de cáncer de vejiga, cáncer de ovario y cáncer de testículo. Debido al alto nivel y al amplio espectro de actividad antitumoral del cisplatino, se ha continuado una extensa investigación en esta área. Tres

medicamentos basados en platino son usados en todo el mundo para el tratamiento del cáncer: cisplatino, carboplatino (cáncer de ovario en estado avanzado) y oxaliplatino (cáncer de colon y el cáncer colorrectal en estado avanzado).^{40–42}

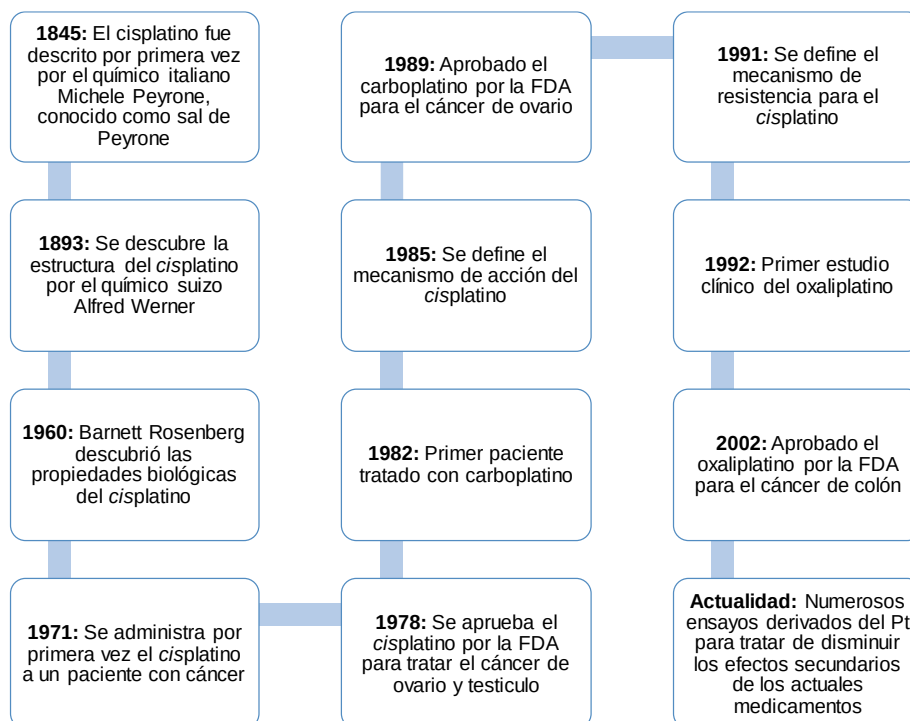


Figura 4. Avances en el campo de los complejos a base de platino cronológicamente, desde el descubrimiento del cisplatino hasta la actualidad.^{43,44}

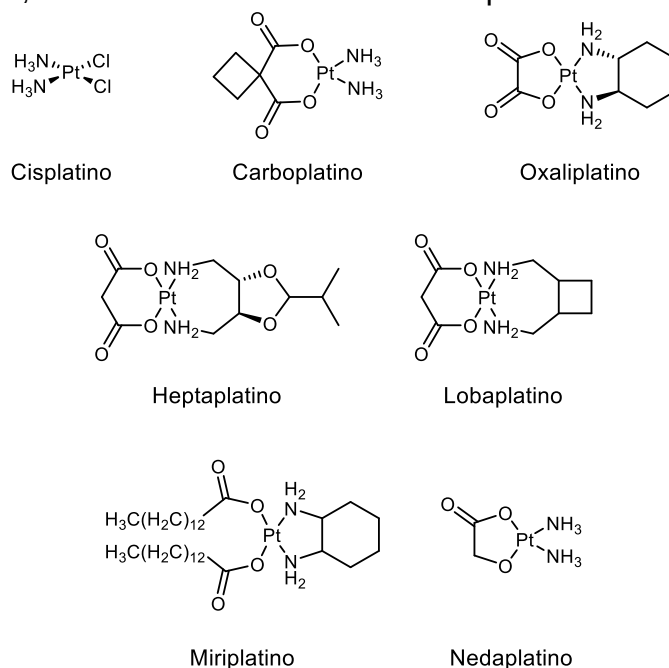


Figura 5. Estructura de fármacos de Pt(II) aprobados a nivel mundial y con aprobación regulatoria en países individuales para el tratamiento del cáncer.

Complejos de platinos y su mecanismo de acción

Los compuestos a base de platino mencionados anteriormente son neutros y presentan una geometría cuadrada plana con ligantes *cis*-amino y ligantes aniónicos en posición *cis*. Los ligantes *cis*-amino pueden ser quelantes o no quelantes y se denominan “ligantes no salientes” porque permanecen unidos al centro del metal, mientras que los ligantes aniónicos pueden ser fragmentos monoiónicos, aniónicos o quelantes dianiónicos y se denominan “ligantes salientes” porque pueden abandonar la esfera de coordinación.⁴⁵

El cisplatino y los medicamentos relacionados a base de platino operan mediante mecanismos de acción similares, implicando cuatro pasos claves:⁴⁶

- (i) Absorción celular.
- (ii) Hidrolisis/activación
- (iii) Unión al ADN
- (iv) Procesamiento celular de lesiones de ADN que conducen a apoptosis.

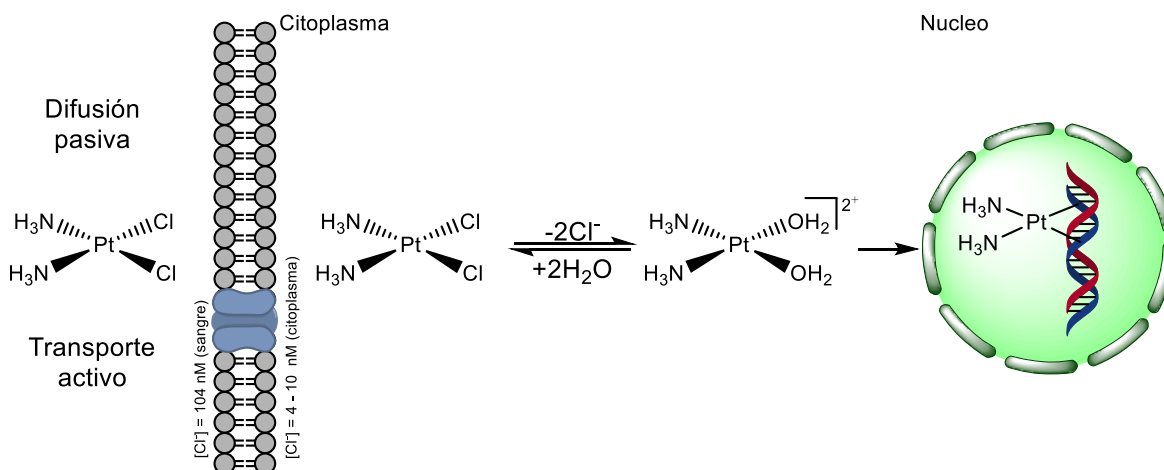


Figura 6. Mecanismo de acción de los compuestos a base de platino.

La quimioterapia con platino se administra por vía intravenosa como una disolución salina. El complejo disuelto debe pasar a través de la membrana celular para interactuar con el ADN nuclear objetivo. Este proceso se conoce como absorción celular. Una vez dentro de la célula, se da la activación, que ocurre cuando el complejo de platino se somete a la sustitución del ligante. Para el cisplatino, esta química se desencadena porque la concentración de iones de cloruro presentes en el citosol es significativamente menor (aproximadamente 4 mM), en comparación con la de la matriz extracelular (aproximadamente 100 mM). Este hecho provoca que los dos átomos de cloro del cisplatino sean susceptibles de sufrir hidrólisis y ser intercambiados por dos moléculas de agua (H_2O) que provienen de los compartimentos celulares. El primer ataque de la molécula de agua al cisplatino libera un ligante cloruro (Cl^-), y el intermedio formado recibe el nombre de monoacuocisplatino ($\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^+$). Como el cisplatino presenta dos ligantes cloruro, se produce un segundo ataque al otro ligante cloruro, generando el intermedio diacuocisplatino ($\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$). Estos productos de platino catiónicos formados (monoacuocisplatino y diacuocisplatino) se unen rápidamente

al ADN, específicamente a la posición N7 de la guanina ya que este es el sitio más nucleófilo en el ADN. Cuando las células experimentan daño en el ADN por los aductos formados, pueden interferir con los mecanismos de transcripción y/o replicación del ADN. Estos daños al ADN inducen a la detención del ciclo celular y, por lo tanto, conducen a la muerte celular por apoptosis.^{45,46}

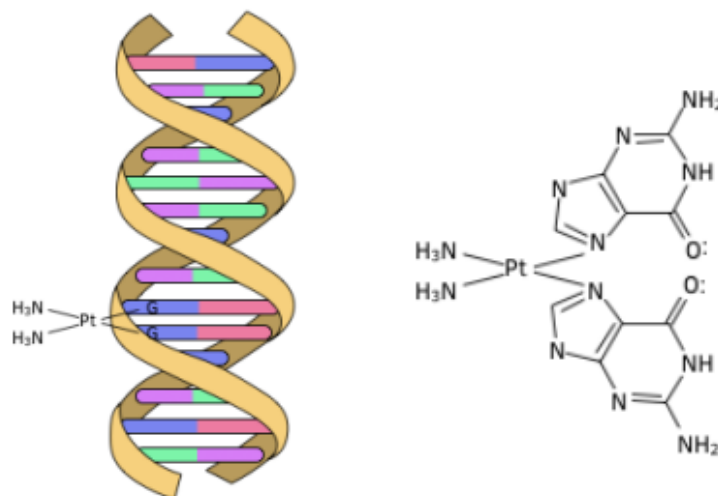


Figura 7. Aducto de ADN-cisplatino.⁴⁷

A pesar del éxito, estos medicamentos a base de platino presentan una serie de efectos secundarios graves que han limitado su uso clínico debido a su baja selectividad por el tejido canceroso sobre el tejido normal. La poca selectividad se debe a los altos requerimientos de nutrientes de las células cancerosas. Entonces, estos fármacos son absorbidos por células cancerosas de rápido crecimiento, pero también son absorbidos por otros tejidos que crecen rápidamente.⁴⁰

Los tejidos de rápido crecimiento que pueden verse afectados por los medicamentos a base de platino usados en la quimioterapia incluyen las membranas mucosas de la boca, la garganta, el estómago y los intestinos. Los cuales conducen a toxicidades gastrointestinales. También se incluye la médula ósea, lo que puede llevar a una reducción de la producción de glóbulos blancos y rojos. Los folículos capilares también comprenden células de rápido crecimiento, lo que significa que los medicamentos a base de platino pueden provocar la pérdida de cabello (alopecia), que incluye cejas, vello facial y corporal, así como folículos capilares en el oído, provocando ototoxicidad (daño en el oído). Finalmente, los medicamentos usados en la quimioterapia también muestran nefrotoxicidad (daño renal) y hepatotoxicidad (daño hepático). El daño renal surge porque la excreción de las drogas ocurre por la orina y la toxicidad hepática surge porque el cuerpo trata de metabolizar y eliminar los fármacos en el hígado.⁴⁰

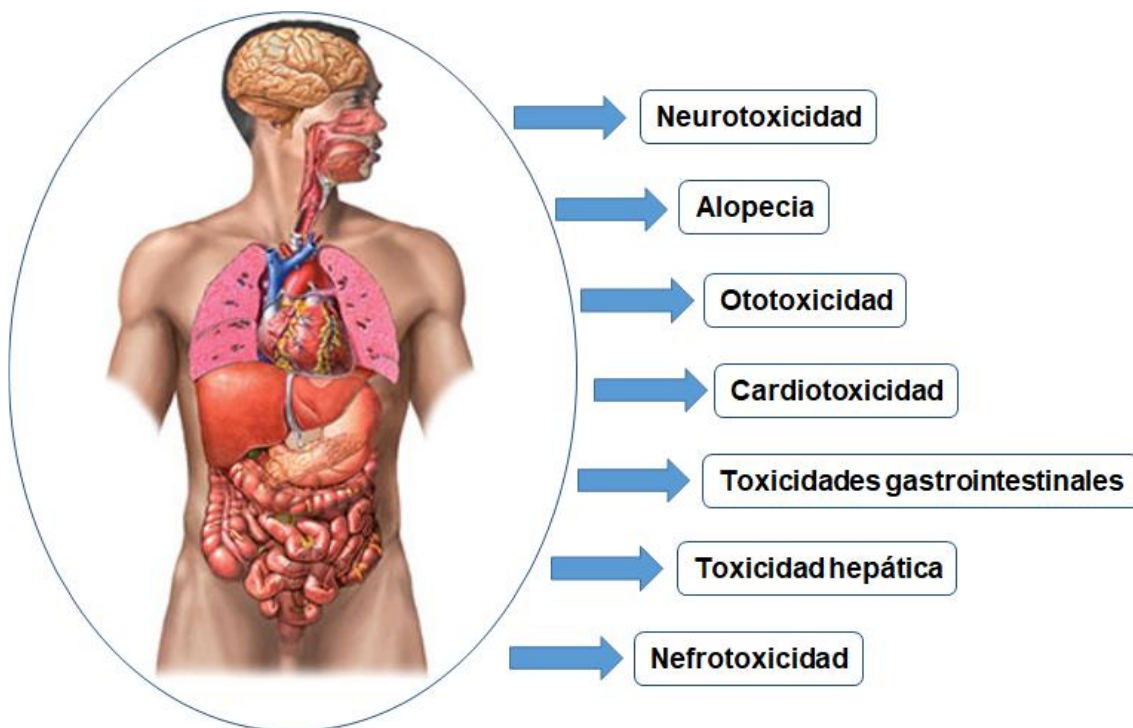


Figura 8. Efectos secundarios que pueden provocar los medicamentos a base de platino.

Terapia fotodinámica

Otra forma de quimioterapia implica la aplicación de la luz visible. La terapia fotodinámica (PDT) surge como una terapia emergente en el tratamiento del cáncer que ha sido aprobada por la FDA de los Estados Unidos de América y se utiliza para el tratamiento de enfermedades neoplásicas y no malignas.^{6,7}

En el año 1900 cuando el estudiante de medicina Oscar Raab junto con el profesor Herman von Tappeiner en Munich (Alemania) investigaban los efectos de los colorantes de acridina en los protozoos. Durante una tormenta descubrieron por casualidad que la combinación de la luz de los relámpagos y el rojo de acridina mataban más eficientemente los protozoos que en ausencia de luz o que el rojo de acridina solo.^{48,49} Raab asoció esta propiedad de los colorantes (citotoxicidad mediada por la luz) a la transferencia de energía de la luz al compuesto químico (similar al proceso de fotosíntesis). Este descubrimiento condujo a la primera aplicación médica terapéutica de una interacción entre un compuesto sensible a la luz denominado fotosensibilizador (PS) y luz. Von Tappeiner, junto con un dermatólogo llamado Jesionek, utilizaron una combinación de eosina aplicada tópicamente y luz blanca para tratar tumores en la piel.⁵⁰ Tiempo después, Von Tappeiner junto con Jodlbauer, lograron demostrar que el oxígeno era esencial para estas reacciones de fotosensibilización y fue hasta el 1907 que introdujeron el término "acción fotodinámica" para describir este fenómeno.^{48,51}

Componentes básicos de la PDT en el cáncer

La PDT es un procedimiento que consta de dos etapas. La primera etapa consiste en administrar al paciente un fotosensibilizador, se espera un determinado tiempo para que el PS se acumule en el tumor y luego se estimula con cierta longitud de onda (dentro del espectro de absorción del PS). En la segunda etapa, el PS puede promover dos tipos de reacciones. En la reacción tipo 1 ocurre una transferencia de electrones, los cuales pueden reaccionar directamente con biomoléculas, como proteínas y lípidos, para generar especies reactivas de oxígeno (ROS) como superóxido y peróxido ($O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2) que inducen la muerte de las células cancerosas. En la reacción tipo 2 al estimular el PS con cierta longitud de onda ocurre una transferencia de energía al oxígeno molecular, también llamado oxígeno triplete (3O_2) presente en el tejido, dando lugar a la producción de oxígeno singlete (1O_2) el cual es una especie altamente reactiva y citotóxica y puede interactuar con las células dentro del tejido objetivo, provocando la muerte celular. Una característica principal del PS es que no debe ser tóxico en condiciones de oscuridad.⁵²

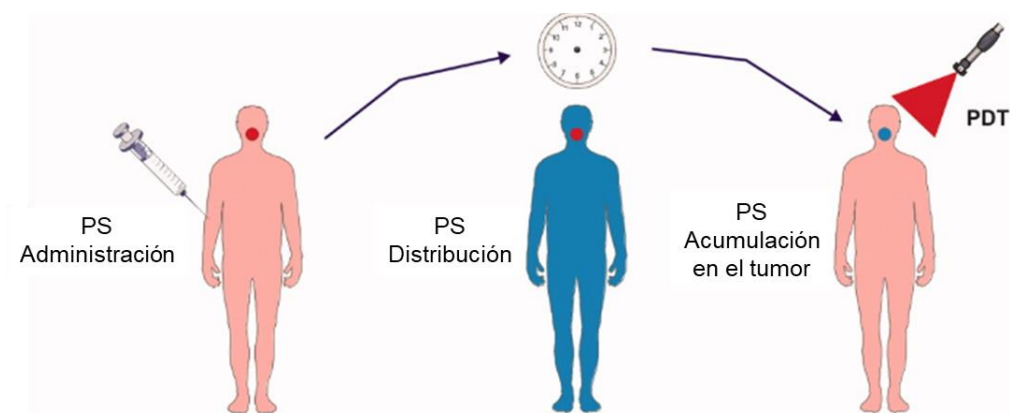


Figura 9. Administración de un fotosensibilizador (PS) de forma sistémica.

Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica

El procedimiento de la PDT consta de tres componentes claves:

- (i) Un compuesto químico fotosensible llamado fotosensibilizador (PS).
- (ii) Una fuente de luz (lámpara, láser o diodo emisor de luz)
- (iii) Oxígeno molecular (3O_2) intracelular

Las interacciones energéticas de estos tres componentes son indispensables en la PDT (ver el diagrama de Jablonski simplificado en la **Figura 10**). El PS en su estado electrónico basal (PS_0), al absorber luz de cierta longitud de onda (**a**), alcanza un primer estado singlete excitado ($^1PS^*$) el cual tiene un tiempo de vida corta ($\sim 10^{-6}$ s). El PS excitado puede regresar a su estado basal emitiendo la energía absorbida como fluorescencia (**b**) o en forma de calor, por conversión interna (**c**). Alternativamente el PS en el estado excitado puede cambiar a un primer estado excitado triplete ($^1PS^*$) mediante un proceso conocido como cruce intersistema con un tiempo de vida largo ($\sim 10^{-2}$ s) (**d**). El PS en su estado triplete

excitado puede regresar a su estado basal al emitir un fotón (fosforescencia) (e). En el estado $^1PS^*$ el PS tiene una vida media suficientemente larga para participar en las siguientes dos reacciones químicas (f):^{9,11}

- **Reacción tipo I:** El PS en su estado $^3PS^*$ puede transferir un electrón a las biomoléculas presentes en el medio biológico como agua, proteínas o ácidos grasos poliinsaturados en los lípidos de la membrana celular, para formar radicales orgánicos que al interactuar con el oxígeno celular pueden generar especies reactivas de oxígeno (ROS) citotóxicas, por ejemplo, anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidropéroxido ($HOO^{\cdot}$), peróxidos (H_2O_2 , $ROOH$) y radical hidroxilo ($HO^{\cdot}$), los cuales pueden inducir procesos que llevan a la muerte celular.^{9,11}
- **Reacción tipo II:** Inicia con la transferencia de energía triplete-triplete del estado $^3PS^*$ al oxígeno molecular (3O_2) presente en el tejido, lo que resulta en la formación de oxígeno singulete (1O_2), el cual es una especie altamente reactiva y es la especie relacionada mayoritariamente con los efectos citotóxicos de la PDT.^{9,11}

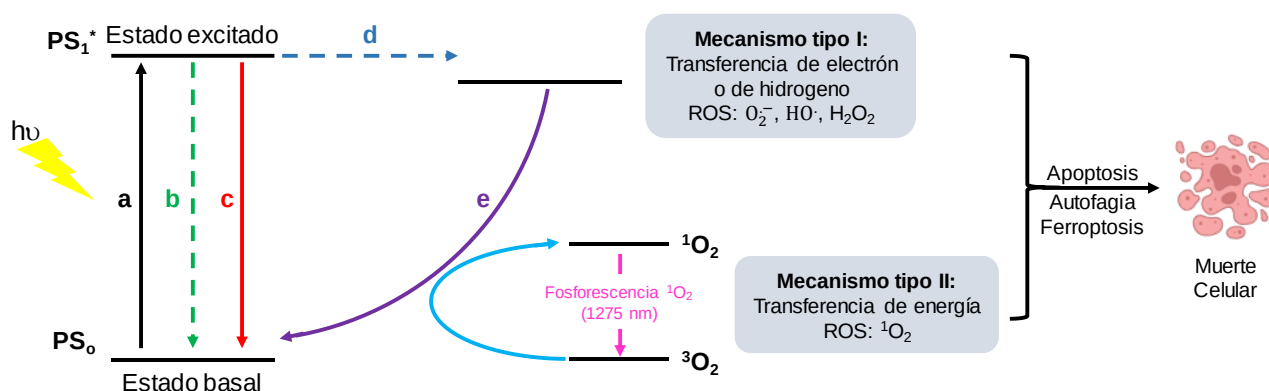


Figura 10. Proceso de fotosensibilización explicado mediante el diagrama de Jablonsky simplificado. Absorción (a), fluorescencia (b), conversión interna (c), cruzamiento intersistema (d), fosforescencia (e) y finalmente, formación de especies reactivas de oxígeno.

La PDT actúa directamente sobre las células produciendo daño tisular (lesión o lastimadura que sufre la piel), o bien de forma indirecta sobre el sistema produciendo daño vascular (daño u obstrucción en los vasos sanguíneos) lo que priva al tumor de oxígeno y nutrientes, la desestabilización de la matriz extracelular o iniciar procesos inflamatorios. El oxígeno singulete es una forma muy reactiva de oxígeno y puede matar directamente las células tumorales. Una ventaja es que su radio de acción es muy limitado ($<0.02\text{ }\mu\text{m}$) por lo que solo puede afectar las células próximas al área de producción de ROS.^{9,11,53,54}

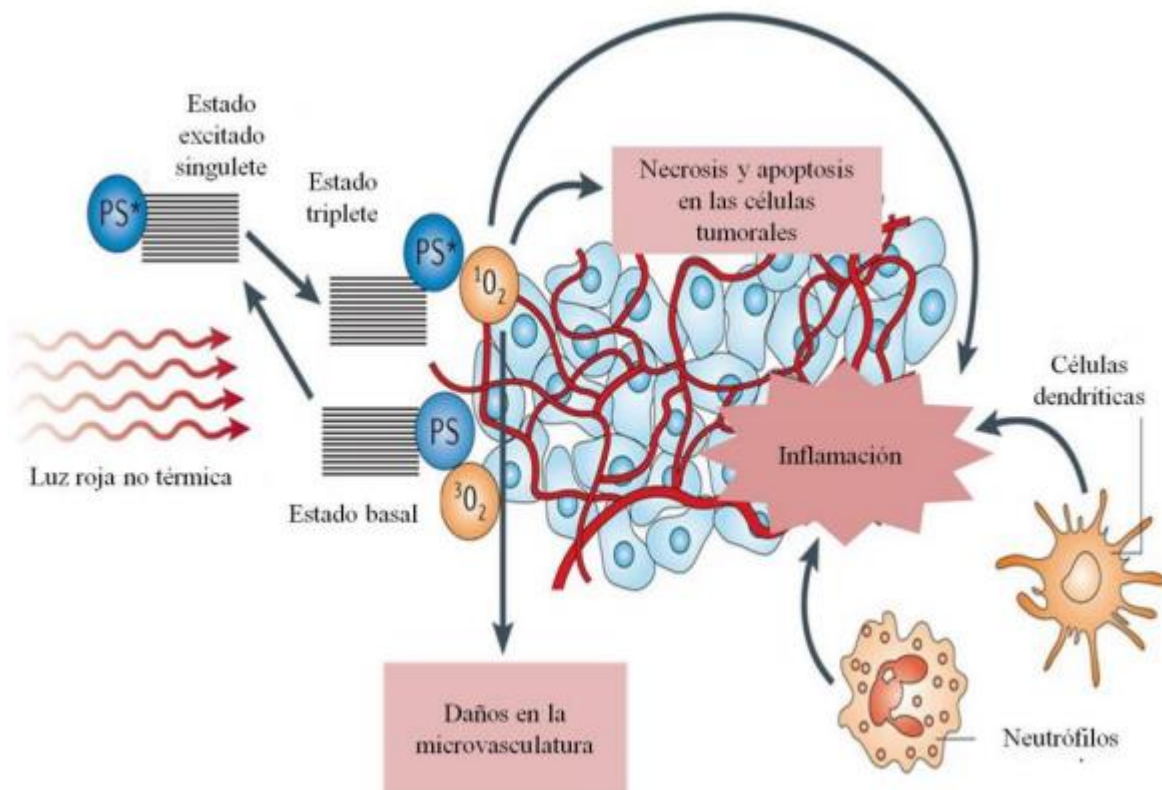


Figura 11. Actuación del 1O_2 en una célula.⁵⁴

Ventajas y desventajas de la terapia fotodinámica

Los estudios han demostrado que la PDT puede ser tan eficaz como la cirugía o la radioterapia en el tratamiento de ciertos tipos de cánceres y precánceres. Presentando las siguientes ventajas:⁵⁵

- No causa efectos secundarios a largo plazo cuando se utiliza correctamente.
- Es menos invasivo que la cirugía.
- Por lo general, toma sólo un corto tiempo y más a menudo se hace como un procedimiento ambulatorio.
- La PDT se puede administrar con mucha precisión.
- A diferencia de la quimioterapia y radioterapia, la PDT se puede repetir varias veces en el mismo sitio si es necesario.
- A menudo cuesta menos que otros tratamientos contra el cáncer.
- La PDT es selectiva solo a células cancerosas.

Pero como todo tratamiento, la PDT también presenta algunas desventajas:

- La PDT no se puede usar para tratar tumores grandes y metástasis.
- Los medicamentos utilizados para la PDT dejan a las personas muy sensibles a la luz durante algún tiempo, por lo que se deben tomar precauciones especiales después de aplicar los medicamentos dentro del cuerpo o sobre su superficie.

- La PDT solo puede tratar áreas donde la luz puede llegar. Esto significa que se utiliza principalmente para tratar problemas justo debajo de la piel, o en el revestimiento de los órganos que se pueden alcanzar con una fuente de luz.

La penetración de la luz ha sido uno de los principales problemas ya que cada tumor tiene una ubicación diferente, es decir unos se encuentran en tejidos profundos y otros son superficiales. Por lo tanto, la selección de la fuente de luz es de gran importancia (**Figura 12**).⁵⁶

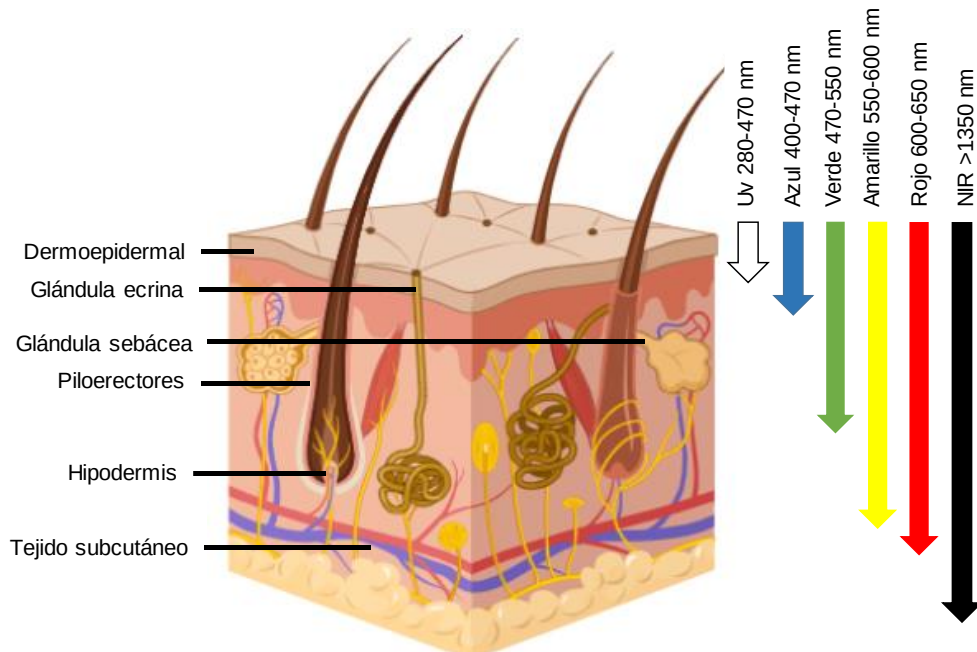


Figura 12. Penetración de la luz en el tejido dependiendo de la longitud de onda.

Es por esta razón que para cada tipo de cáncer que se quiera tratar mediante la PDT se deben contemplar diferentes parámetros en las fuentes de luz y los dispositivos de administración.⁴⁹

Fotosensibilizadores en la PDT para tratar el cáncer

El primer fotosensibilizador aprobado para la PDT fue sintetizado por Dougherty y sus colaboradores en el 1983, el cual, fue una mezcla soluble en agua de porfirinas que se denominó como Photofrin®. Desde entonces, los químicos han intentado sintetizar y descubrir nuevas moléculas que podrían actuar como PS mejorados, y ahora se han propuesto cientos de compuestos orgánicos e inorgánicos como (PS) potencialmente útiles para la PDT para abordar el cáncer. A continuación se muestran algunos PS que están siendo estudiados y otros que ya han sido aprobados por la FDA para su uso en la PDT son:

- **ALA y MAL:** El ácido 5-aminolevulínico (ALA) y metil-5-aminolevulinato de metilo (MAL) son PS que se aplican de manera tópica y luego se irradian con luz roja. ALA y MAL son PS aprobados por la FDA para tratar pacientes con carcinoma basocelular superficial.⁵⁷

- **Hipericina:** Es un PS extraído de manera natural de la planta *Hypericum perforatum*. Presenta una absorción máxima a 590 nm y ha sido estudiado como PS para neoplasias malignas de la piel.^{58,59}
- **Riboflavina:** También conocido como la vitamina B2, es un PS soluble en agua y ha sido utilizado para tratar neoplasias malignas de la piel. Su uso se ve obstaculizado debido a su degradación al ser expuesto a la luz.⁶⁰
- **Complejos de osmio:** Numerosos complejos de osmio(II) con ligantes polipiridílicos han sido estudiados como PS en la PDT en neoplasias diferentes al cáncer de piel como el cáncer cervical,⁶¹ vejiga,⁶² glioblastoma,⁶² entre otros. Se obtuvieron resultados interesantes ya que complejos a base de este metal muestran bandas de absorción a longitudes de onda mayores a 650 nm, cerca del infrarrojo cercano (NIR) indicando que usando esta clase PS se pueden tratar tumores que se encuentran en tejidos profundos.
- **TLD1433:** Un compuesto a base de rutenio, sintetizado por McFarland. El TLD1433 se encuentra en ensayos clínicos fase II para usarse como PS en el tratamiento del cáncer de vejiga no invasivo muscular.^{63,64}
- **GRBA y GRPA:** Son PS a base de rutenio estudiados en la PDT para tratar el cáncer de mama triplenegativo y el cáncer de ovario, los cuales han mostrados buenos resultados después de la irradiación con luz azul. GRBA y GRPA son solubles en agua y han demostrado producir altas cantidades de $^1\text{O}_2$.⁶⁵

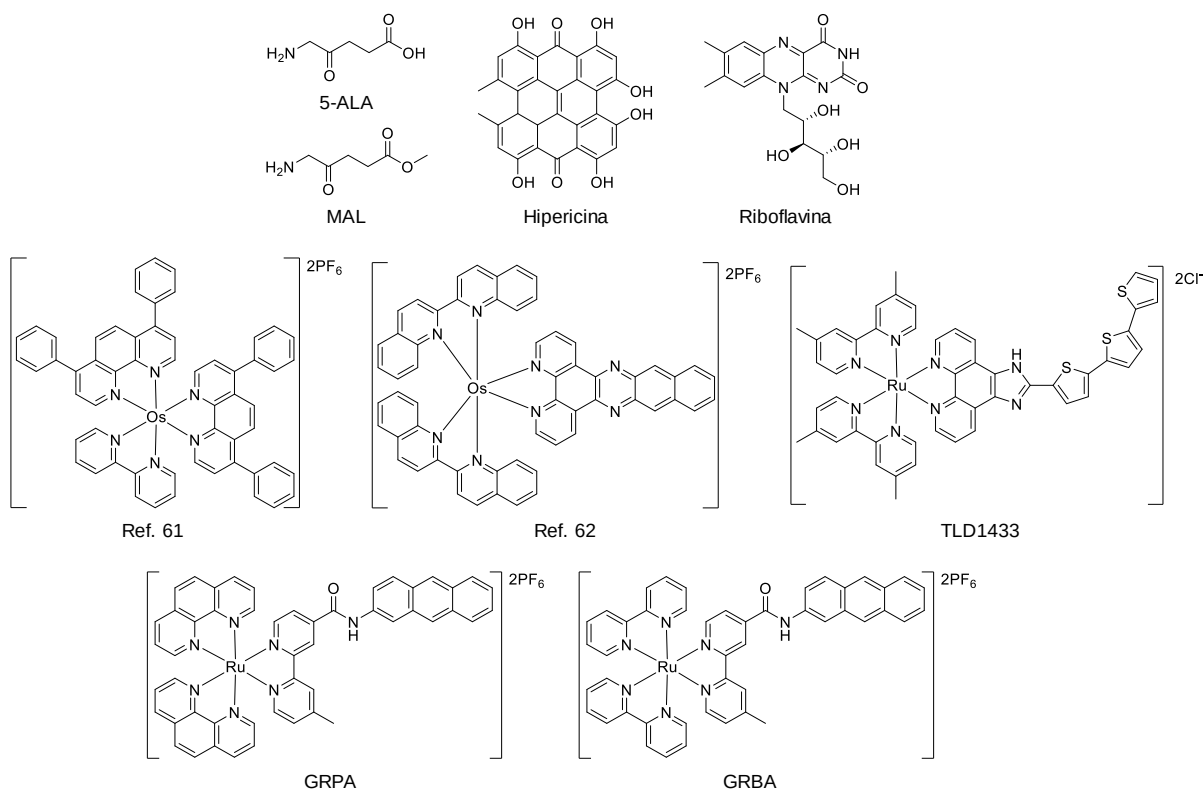


Figura 13. Estructuras de algunos PS empleados para la PDT en cáncer.

Sin embargo, las estructuras a base de tetrapirrol constituyen el grupo más grande de PS que se han empleado para aplicaciones anticancerosas.⁶⁶

2.2 Tetrapirroles

La química de los compuestos que presentan tetrapirroles ha sido estudiada por más de 200 años, siendo una clase de macrociclos compuestos por cuatro unidades de pirrol unidos a través de puentes de metino, para formar un macrociclo aromático que contiene entre 18 y 22 electrones π conjugados.⁶⁷ La primera porfirina (ver **Figura 14** - porfirina) fue descrita por Rothmund y por Fischer y Gleim en el año 1936.^{68,69} Para nombrar las porfirinas, se comienza por enumerar las unidades pirrólicas con números romanos del I al IV o con las letras A-D, como se observa en la **Figura 14**; los puentes metilenos se ordenan con letras griegas (α , β , γ y δ); las posiciones de los sustituyentes son contados del 1 al 8, iniciando con la unidad pirrólica I o A, Todas estas enumeraciones se realizan en sentido de las manecillas del reloj como se muestra en la **Figura 14**.⁷⁰⁻⁷²

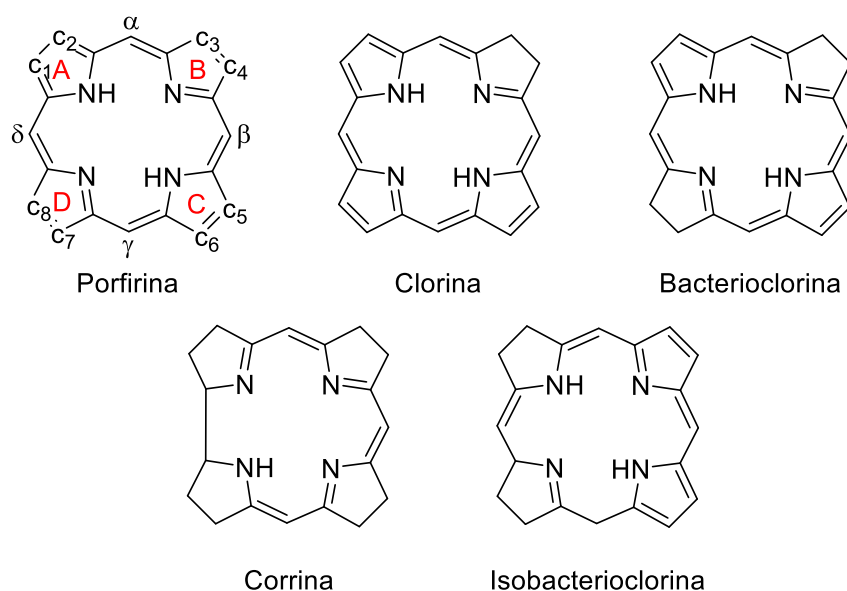


Figura 14. Nomenclatura del núcleo porfirínico, estructura y derivados.

Las porfirinas y sus análogos (clorinas, bacteriocloriginas, isobacteriocloriginas y corrinan **Figura 14**), han sido estudiadas como celdas solares sensibilizadas por colorantes (DSSC), en fotocátalisis y electrónica molecular. Estas estructuras altamente conjugadas presentan una absorción intensa en las regiones UV y visible del espectro electromagnético.⁷³ La fotoquímica de las porfirinas y sus derivados han sido y siguen siendo estudiadas debido a que exhiben bandas de absorción electrónicas intensas en la región visible como se mencionó anteriormente. Una banda de absorción fuerte ($\epsilon \sim 5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) alrededor de los 380-450 nm llamada banda B (o banda de Soret) y cuatro bandas de absorción débiles entre 450 y 700 nm llamadas bandas Q (QI, QII, QIII y QIV).^{67,74} Debido estas fuertes absorciones en la región visible se han convertido en componentes clave para la captación de luz.⁷⁴

Algunos de los ejemplos más notables de las porfirinas son la protoporfirina IX y su complejo de hierro que constituye el grupo hemo (el cual es el encargado de transportar el oxígeno a través de la sangre). Las metalocloriginas con magnesio que

forman la feofitina y bacteriofeofitina, más conocidas como la clorofila (la cual es la encargada de la transformación de la energía de la luz solar en energía química mediante un proceso conocido como fotosíntesis) y la bacterioclorofila (pigmentos primarios en plantas, algas y cianobacterias) (ver **Figura 15**).^{73,75}

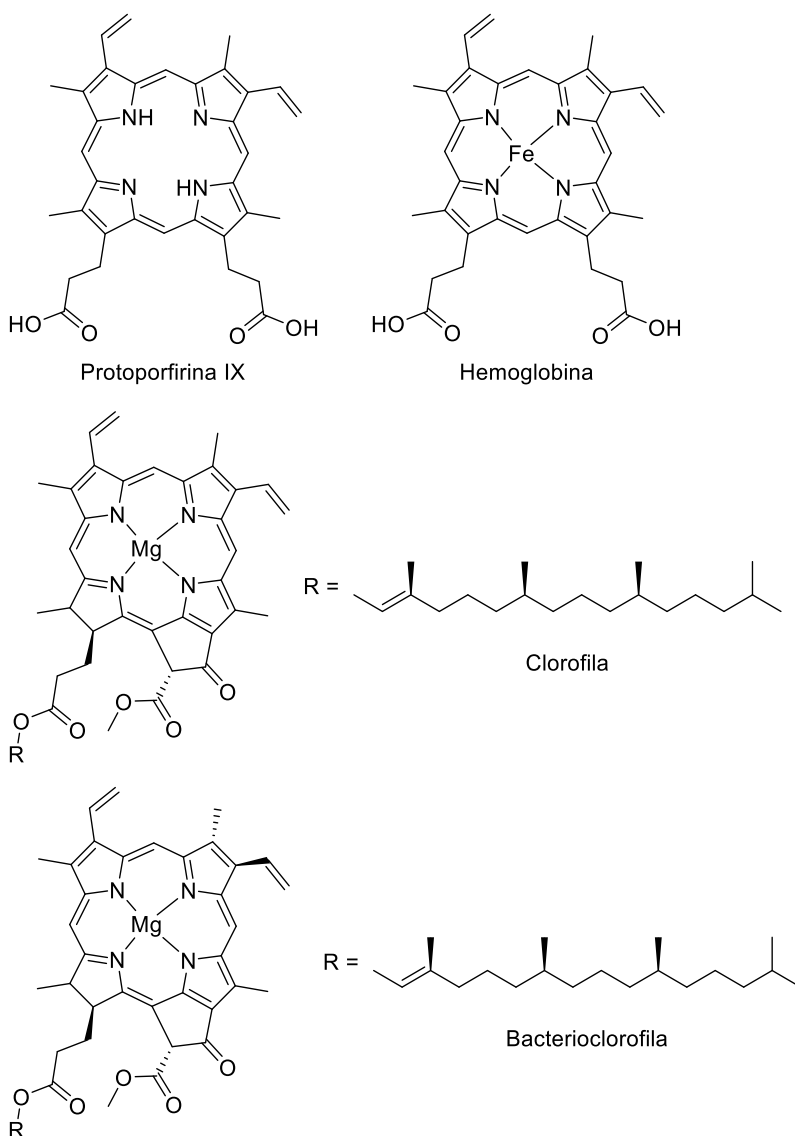


Figura 15. Algunos de los ejemplos más notables de porfirinas.

Tetrapirroles en la terapia fotodinámica

Los compuestos a base de tetrapirroles son conocidos por su uso en aplicaciones médicas, en particular como fotosensibilizadores en la terapia fotodinámica, ya que PS tetrapirrolícos han demostrado no ser tóxicos en ausencia de luz. Sin embargo, tras la irradiación, estas estructuras pueden sufrir una cascada de procesos fotoquímicos para producir especies reactivas de oxígeno, capaces de desencadenar la muerte celular y conducir a la erradicación del tumor.⁷⁵

Algunos fotosensibilizadores basados en tetapirroles clínicamente aprobados o que se encuentran en fase de prueba son:

- **Photofrin (porfímero de sodio):** Es un fotosensibilizador de primera generación. Consiste en una mezcla de dímeros y oligómeros de hematoporfirina en el que las unidades de porfirina están unidas por enlaces tipo éster. Se informó por primera vez la preparación de Photofrin® en 1983.⁷⁶ Photofrin® se administra mediante inyección intravenosa (dosis 2-5 mg/kg) seguido de una estimulación con un haz de luz de 630 nm después de 24-48 h. Photofrin® ha sido aprobado para el uso clínico contra cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer de vejiga y cáncer cervical a nivel mundial.^{76,77}
- **Foscan (temoporfina):** Es un fotosensibilizador de segunda generación, cuyo núcleo principal es una clorina. Su síntesis, propiedades fotofísicas y fototoxicidad se reportaron en 1989.⁷⁸
Temoporfina se administra en una mezcla (agua/polietilenglicol400/etanol = 5/3/2, v/v/v) por inyección intravenosa (dosis 0.15 mg/kg) seguido de una estimulación con un haz de luz de 652 nm a las 24-96 h. El uso de temoporfina ha sido investigado contra el cáncer de esófago, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de próstata y cáncer de piel y su uso clínico ha sido aprobado solo contra carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello. Además, temoporfina también ha sido investigado en ensayos clínicos de fase II contra carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma nasofaríngeo y carcinoma de las vías biliares en Europa, Estados Unidos y Canadá.^{77,79,80}
- **Fotoclora:** Fotosensibilizador lipofílico diseñado para la penetración de la membrana celular. Se informó la preparación de Fotoclora® en 1996.⁸¹ Se administra a través de una inyección intravenosa (dosis 0.15 mg/kg) seguido de la irradiación con un haz de luz de 665 nm a las 24-48 h. Ha sido investigado en fases I/II contra el cáncer de esófago y pulmón en etapa tardía.⁷⁷
- **Laserphyrin (talaporfina):** Es un fotosensibilizador de segunda generación soluble en agua. Se administra a través de una inyección intravenosa (dosis 0.5-3.5 mg/kg) seguido de la irradiación con un haz de luz de 664 nm 4 h después de la inyección. Laserphyrin® fue aprobado para uso clínico contra el cáncer de pulmón en etapa temprana en 2003 en Japón, y se encuentra en estudios de fase III para cáncer de hígado y cáncer de cuello recurrente y cáncer de cabeza.^{77,82}
- **Visudina (verteporfina):** Fue sintetizado por primera vez en 1998.⁸³ Se administra a través de una inyección intravenosa (dosis 0.3 mg/kg) seguido de la irradiación con un haz de luz de 690 nm 3-5 h después de la inyección. Visudina® se usa generalmente como fotosensibilizador liposomal y se acumula eficientemente en el tejido neovascular del ojo. Fue aprobada para uso clínico contra la degeneración macular relacionada con la edad para oftalmología y artritis reumatoide para inmunomoduladores en 26 países y ha sido investigado en un ensayo clínico de fases I/II contra malignidades cutáneas y psoriasis (enfermedad frecuente de la piel que acelera el ciclo de vida de las células cutáneas). Además, se ha demostrado que la

verteporfina es un supresor de la proteína YAP y que a su vez puede bloquear la actividad transcripcional oncogénica.^{77,84}

Otros fotosensibilizadores porfirinoides clínicamente aprobados o que se encuentran en fase de prueba son: Purytin® (investigado en la fase II/III de ensayos clínicos contra adenocarcinoma de mama metastásico, carcinoma de células basales (BCC) y el sarcoma de Kaposi (cáncer que provoca lesiones en los tejidos blandos). En pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida, SIDA);⁸⁵ Lutrin® (aprobado para uso clínico contra el cáncer de próstata recurrente y el cáncer cervical y se ha investigado en ensayos clínicos de fases I/II/III contra el cáncer de mama)⁸⁶ y Photosens® (ha sido investigado en ensayos clínicos de fase III contra el cáncer de piel, cáncer de mama, cáncer de orofaringe, cáncer de pulmón y cáncer de laringe).^{77,87}

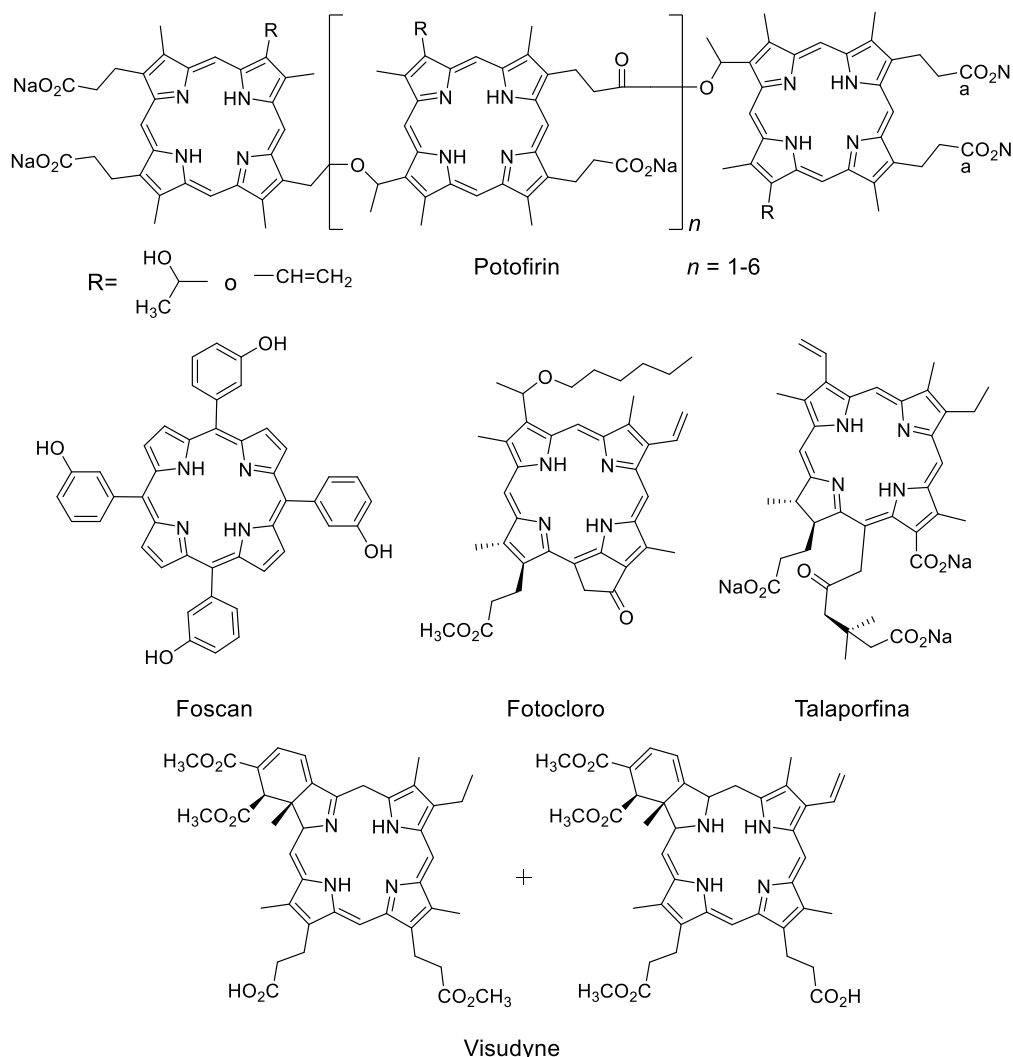


Figura 16. Estructura de algunos fotosensibilizadores a base de tetrapirroles usados para la PDT.

2.3 Metaloporfirinas

Complejos metálicos de porfirinas son ampliamente utilizados en el diseño de sistemas fotosintéticos artificiales debido a que presentan un alto coeficiente de absorción molar al igual que las porfirinas libres.⁸⁸ Las propiedades de emisión de los derivados de metaloporfirina determinan su aplicación como cromóforos fluorescentes para la detección de aniones, pares de iones, productos químicos orgánicos volátiles, compuestos nitroaromáticos, gases y especies reactivas de oxígeno.^{89–92} Las propiedades catalíticas de los complejos metálicos de porfirinas también han sido estudiadas ampliamente para la aplicación en una gran variedad de transformaciones orgánicas como: aminación catalítica de C-H, catalizadores para la oxidación del ciclohexano, activación y transporte de oxígeno en el grupo hemo y funcionalización catalítica de C-H por metaloporfirinas.^{93–95}

Además, numerosas investigaciones se centran en el desarrollo de nuevas metaloporfirinas para ser usadas como fotosensibilizadores en la terapia fotodinámica, aplicaciones de fotodiagnóstico y como agentes de contraste para IRM (los medios de contraste son utilizados para mejorar la visualización de estructuras normales o lesiones en las imágenes producidas por rayos X). Otra aplicación de creciente interés es que las metaloporfirinas son candidatos prometedores para su uso como sondas fluorescentes NIR en el tratamiento teranóstico (integración de un método de diagnóstico con una intervención terapéutica) de tumores.^{96–98}

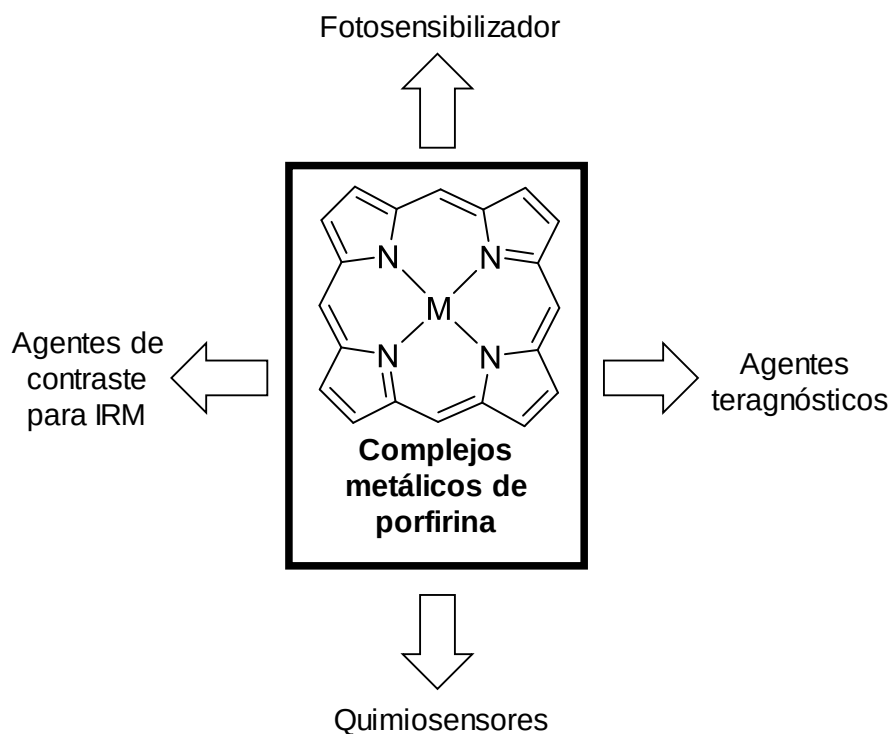


Figura 17. Aplicaciones de metaloporfirinas

Metaloportirinas contra el cáncer

Las metaloporfirinas están presentes en numerosas moléculas de gran importancia para la vida como: la hemoglobina, la clorofila, citocromo P₄₅₀, vitamina B 12, etc., Se debe a la capacidad del centro metálico de unirse al oxígeno (O₂) y a otras moléculas pequeñas como monóxido de carbono (CO), monóxido de nitrógeno (NO), dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O), así como a muchos residuos de aminoácidos proteicos (cisteína, metionina, histidina, etc.). Además, las metaloporfirinas presentan excelentes propiedades de transferencia de electrones del metal, es decir, la capacidad de aceptar y donar electrones.⁹⁹ Otra propiedad de las metaloporfirinas es que se puede modificar la estructura central, es decir la porfirina con diferentes grupos y de esta manera alterar las propiedades químicas redox del centro metálico y la solubilidad.^{100,101}

Se han usado metaloporfirinas con Fe(III) o Mn(III) con el fin de imitar la enzima citocromo P₄₅₀ en presencia de ascorbato y de esta manera convertirse en una poderosa herramienta para un tratamiento de cáncer hepático con efectos secundarios menores para el paciente.⁹⁹

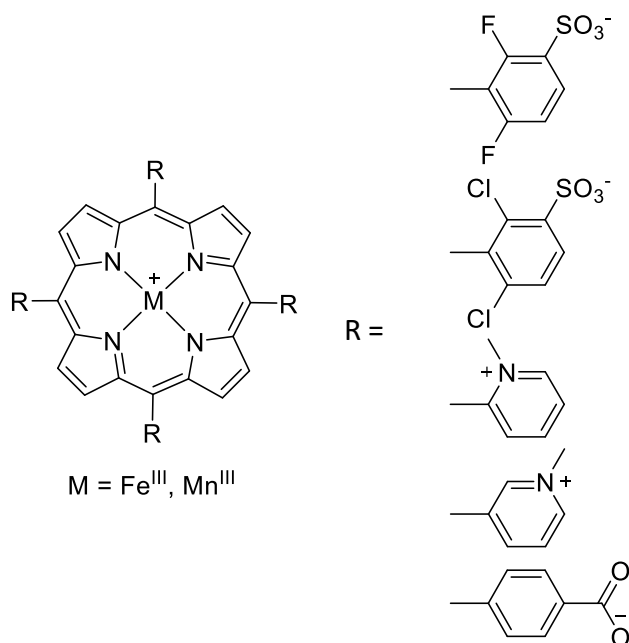


Figura 18. Estructuras de metaloporfirinas a base de Fe(III) y Mn(III).⁹⁹

Por otro lado, existe una metaloporfirina a base de Pd(II) llamado TOOKAD® (Pd-Bpheid), la cual es un fotosensibilizador de tercera generación aprobado para su uso clínico en el tratamiento de cáncer próstata mediante la terapia fotodinámica.¹⁵

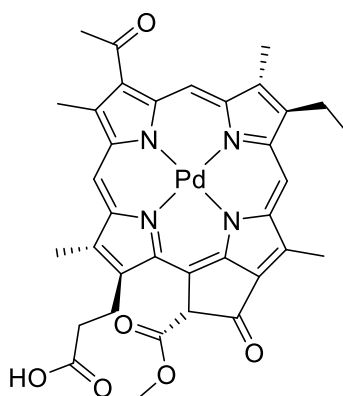


Figura 19. Estructura del TOOKAD®.¹⁵

Además, se ha demostrado que la conjugación de porfirinas con fragmentos metálicos de rutenio en las periferias es una estrategia intrigante para desarrollar compuestos que podrían combinar la citotoxicidad del fragmento metálico con la fototoxicidad de la porfina.¹⁰²

De hecho, el grupo de investigación de Brunner sintetizó una metaloporfirina de platino con el fin de combinar la actividad citotóxica del cisplatino y la fototoxicidad de los derivados de la hematoporfirina en la misma molécula, encontrando que al combinar este metal con una porfina y, irradiando a una longitud de onda de 600 – 700 nm los compuestos se vuelven más activos.¹⁰³

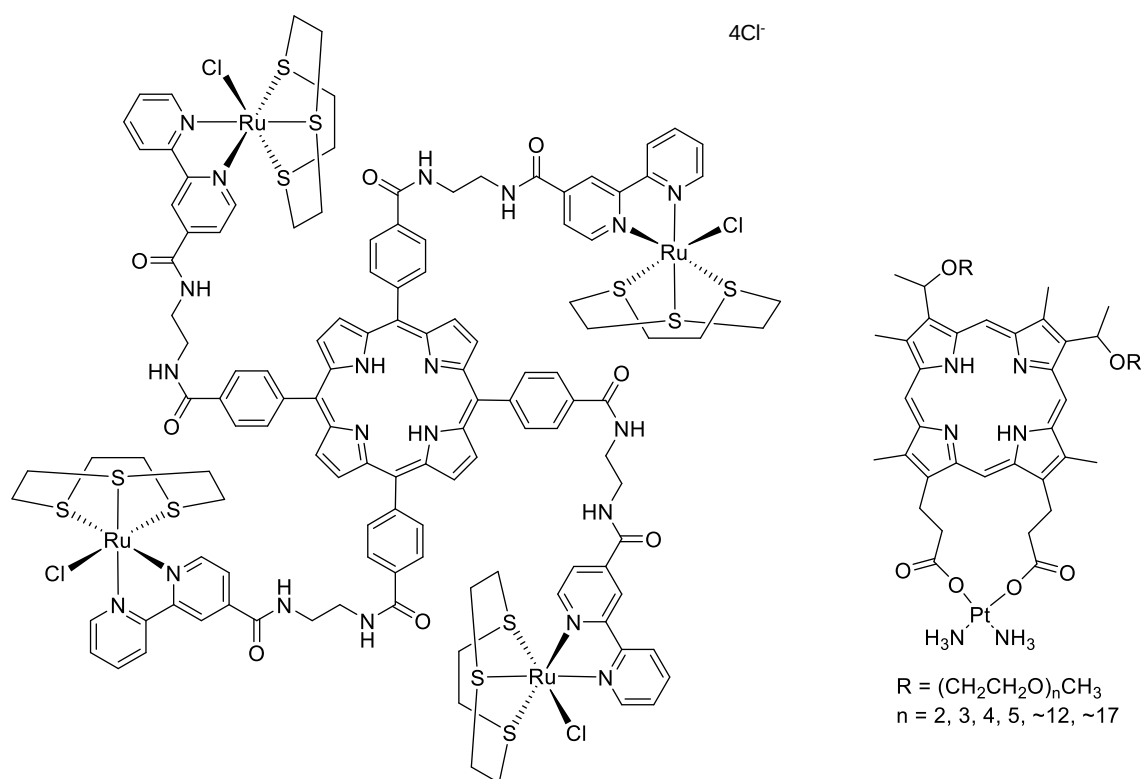


Figura 20. Estructura de metaloporfirinas con metales en las periferias.^{102,103}

Por otro lado, la conjugación de complejos con ligantes polipiridílicos de rutenio(II) con una porfirina en posiciones periféricas, es otra estrategia para mejorar la fototoxicidad del PS. Metaloporfirinas catiónicas pueden interactuar o unirse a proteínas y al ADN y de esta manera pueden conducir a procesos de daño celular, apoptosis y autofagia después de activarse con luz blanca.¹⁰⁴

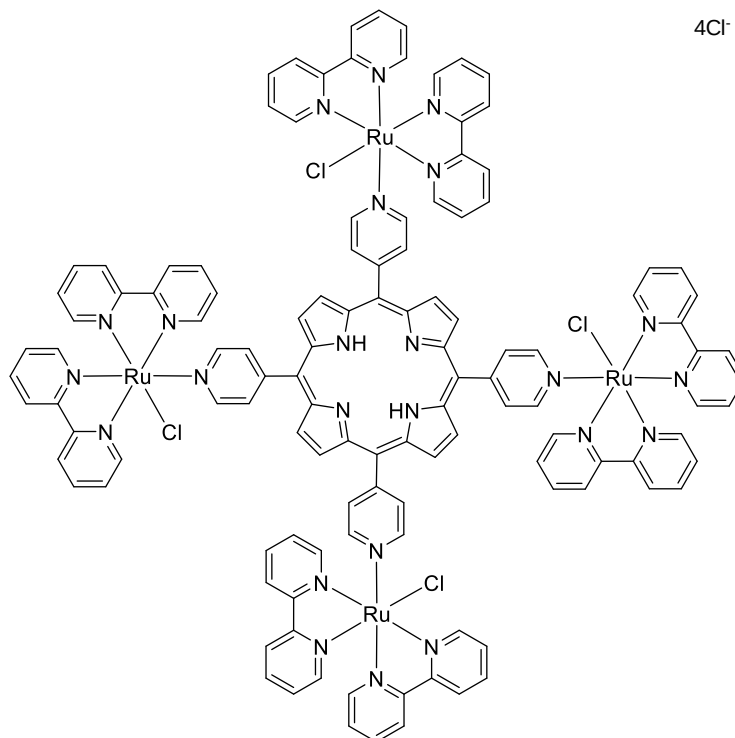


Figura 21. Complejos con ligantes polipiridílicos de rutenio (II) con una porfirina en posición periférica.¹⁰⁴

2.4 El rutenio en la terapia contra el cáncer

El creciente interés por la síntesis de complejos de rutenio se ha propuesto como una alternativa a los complejos de platino. Generalmente, el uso de complejos a base de rutenio en comparación con el cisplatino se caracteriza por una menor toxicidad, mayor eficacia, menor número de efectos secundarios y menor costo comercial. Un atributo importante de los compuestos de rutenio es también su selectividad por las células cancerosas. La eficacia del rutenio en la terapia del cáncer parece estar asociada a las siguientes tres propiedades:

- (i) Presentan una cinética de intercambio de ligantes similar a la de los complejos de platino(II).¹⁰⁵
- (ii) Presentan diferentes estados de oxidación permitiendo así, que el rutenio pueda llevar a la muerte celular mediante diferentes mecanismos de acción. Además, el ascorbato y las proteínas (mitocondriales y microsómicas) encargadas de realizar procesos de transferencia de electrones pueden reducir Ru(III) y Ru(IV), mientras que el oxígeno molecular y la citocromo oxidasa, pueden oxidar fácilmente al Ru(II).¹⁰⁶

- (iii) La capacidad que presenta el rutenio para imitar el hierro al unirse a ciertas moléculas biológicas. Se cree que la baja toxicidad de los complejos a base de rutenio se debe en parte a que el rutenio podría imitar al hierro para unirse a la transferrina sérica y la albúmina, disminuyendo así, la concentración de rutenio en el plasma sanguíneo y aumentando la concentración en las células cancerosas. Los mamíferos utilizan estas dos proteínas (transferrina sérica y la albúmina) para transportar el hierro, y de esta manera reducir su toxicidad.¹⁰⁶

Los complejos de rutenio en la terapia contra el cáncer han atraído un interés creciente en los últimos 20 años, aunque son pocos los complejos de rutenio que han avanzado a ensayos clínicos. El primero en ser probado en ensayos clínicos fue el *trans*-[tetracloro(dimetilsulfóxido)imidazolrutenio(III)] (NAMI-A) estudiado por el grupo de Alessio. NAMI-A había demostrado que tenía potentes efectos inhibitorios sobre la metástasis tumoral y pareció carecer de acciones citotóxicas. Tuvo éxito en los estudios clínicos de fase I, pero desafortunadamente en los estudios clínicos de fase II solo mostraron una eficacia limitada que impidió un mayor desarrollo clínico de NAMI-A.^{63,107}

Posteriormente, el grupo de Keppler diseñó un análogo estructural del NAMI-A el *trans*-[tetracloro(dimetilsulfóxido)imidazolrutenio(III)] (KP1019) que entró en ensayos clínicos por ser citotóxico *in vitro* contra el cáncer colorrectal. KP1019 actúa bloqueando la síntesis de ADN e induciendo la apoptosis a través de la vía mitocondrial. Sin embargo, la escasa solubilidad del KP1019 en agua limitó su desarrollo.⁶⁴

Posterior al KP1019, se sintetizó el KP1339 (complejo de sal de sodio) que en combinación con el medicamento sorafenib (usado para tratamiento de tumor pancreático y el carcinoma hepatocelular). KP1339 exhibe una solubilidad mejorada, una eficacia anticancerosa prometedora y actualmente se encuentra en ensayos clínicos.⁶⁴

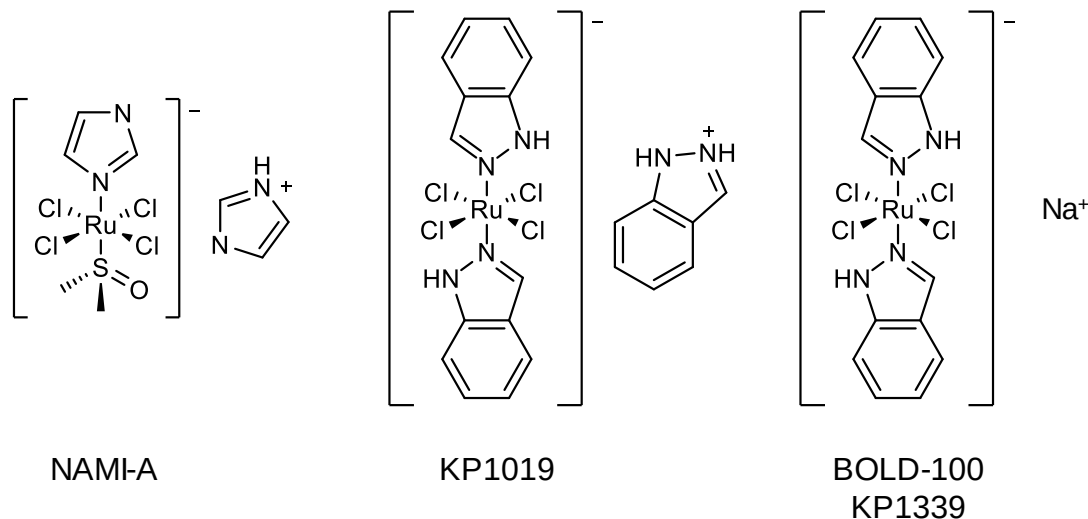


Figura 22. Complejos de rutenio para la terapia contra el cáncer

Otros compuestos de rutenio estudiados en terapia contra el cáncer son complejos de rutenio tipo $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(1,3,5\text{-triaz-7-fosfoadamantano})\text{Cl}_2]$. Por ejemplo, los complejos de rutenio RAPTA-C en combinación con erlotinib (medicamento que se usa para tratar el cáncer del pulmón y cáncer de páncreas), y RAPTA-T mostraron una acción anticancerígena eficaz al inhibir la propagación de metástasis en ratones. Se encontró que RAPTA-C induce la muerte celular en células de carcinoma de ascitis de Ehrlich en ratones, mientras que RAPTA-T mostró tener efectos antiinvasores y antimetastásicos contra las células de cáncer de mama.^{63,108}



Figura 23. Complejos de rutenio tipo $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(1,3,5\text{-triaz-7-fosfoadamantano})\text{Cl}_2]$ usados en terapia contra el cáncer, RAPTA-C (izquierda) y RAPTA-T (derecha).

RM175 y READ son complejos a base de rutenio del tipo $[(\eta^6\text{-areno})\text{RuCl}(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH-N,N}')]\text{PF}_6$ que han sido estudiados en terapia contra el cáncer. RM175 indujo a la apoptosis y READ presentó la capacidad de unirse al ADN y formar aductos con guanina. Este tratamiento con rutenio mostró una potente citotoxicidad en células neoplásicas (formación de un neoplasma o tumor) *in vitro* mediante interacciones con el ADN.⁶³

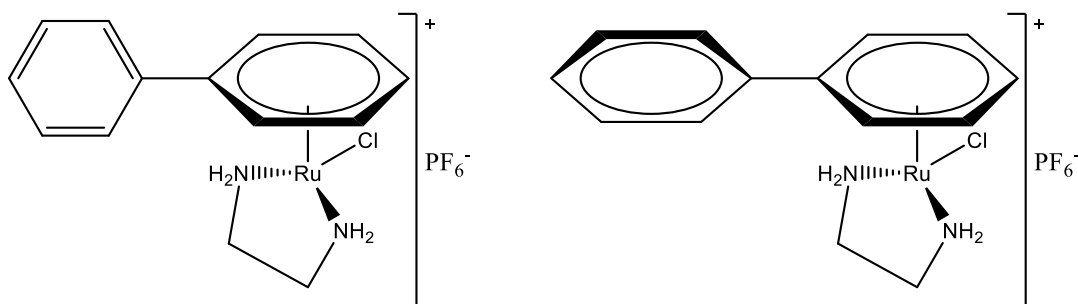


Figura 24. Estructura de los complejos RM175 (izquierda) y READ (derecha).

3. HIPÓTESIS

Las porfirinas, clorinas, metaloporfirinas y metaloclorinas se han consolidado como fotosensibilizadores efectivos en la terapia fotodinámica contra el cáncer, como lo demuestra la aprobación clínica de compuestos como **TOOKAD®**. En este contexto, se plantea que la incorporación de rutenio(II) en porfirinas y clorinas puede ofrecer ventajas adicionales, como una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) vía mecanismos tipo I y II, y la capacidad de conducir a la muerte celular bajo condiciones de hipoxia. Se espera que estos complejos de rutenio mejoren la eficacia del tratamiento sobre células de cáncer gástrico AGS al combinar alta fototoxicidad, baja toxicidad en la oscuridad y mayor selectividad hacia células malignas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Sintetizar y caracterizar fotosensibilizadores de rutenio(II) con ligantes derivados de la protoporfirina-IX y de la verteporfina, para luego, evaluar su actividad citotóxica, tanto antes como después de ser irradiados con luz blanca, en células de cáncer gástrico, con el fin de determinar su eficacia en la terapia fotodinámica.

4.2. Objetivos específicos

- Sintetizar ligantes derivados de la protoporfirina-IX y de la verteporfina.
- Coordinar los ligantes al rutenio.
- Evaluar la lipofilicidad de los ligantes y complejos.
- Estudiar la estabilidad de los compuestos en diferentes medios mediante el uso del UV-Vis.
- Estudiar la producción de ROS por los ligantes y complejos
- Evaluar la citotoxicidad *in vitro* de los nuevos complejos de rutenio en líneas celulares de cáncer gástrico.
- Determinar el tipo de muerte celular inducido por los ligantes y complejos sintetizados mediante la expresión de marcadores específicos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Síntesis y caracterización

Para la preparación de las porfirinas **dMePpIX** y **dBnPpIX** (Figura 25) se partió de la protoporfirina disódica IX (**dNaPpIX**), mediante una modificación a la metodología reportada en la literatura.¹⁰⁹ Se logró mejorar el rendimiento de la reacción de un 54% reportado a un 98% para la porfirina **dMePpIX**.

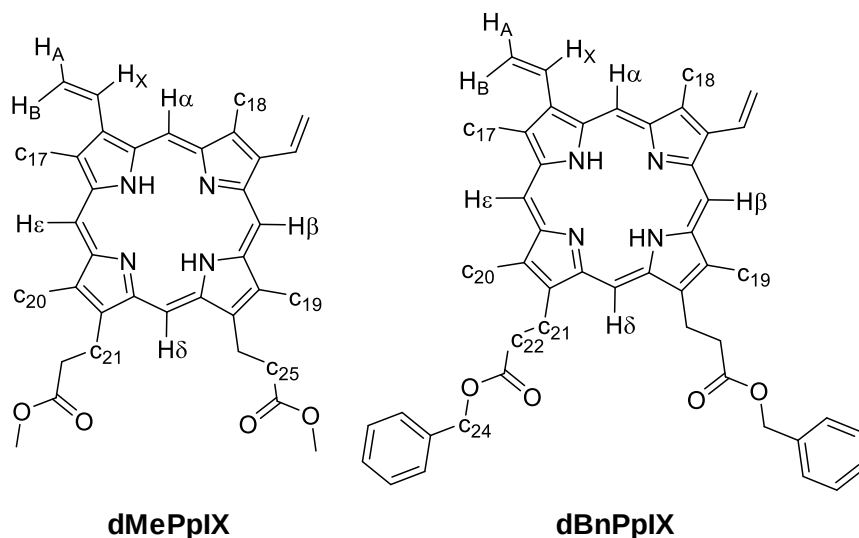
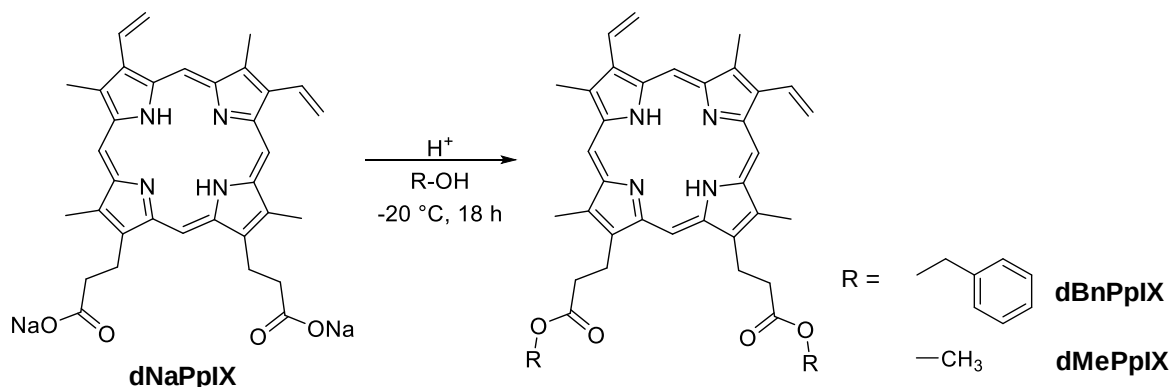


Figura 25. Estructura y enumeración de las porfirinas sintetizadas.

La porfirina **dBnPpIX** también se obtuvo en alto rendimiento (89%) al realizar varias modificaciones a la metodología reportada,¹⁰⁹ Durante los primeros ensayos de síntesis del compuesto **dBnPpIX**, los rendimientos eran muy bajos, debido a que el alcohol bencílico en presencia de H_2SO_4 se polimerizaba.¹¹⁰ Por lo tanto, después de varios ensayos con diferentes ácidos, encontramos que al usar alcohol bencílico con un 5% de HCl se mejoraba la obtención del producto.



Esquema 1. Síntesis de **dMePpIX** y **dBnPpIX**.

El espectro de RMN ^1H de **dMePpIX** fue consistente con lo reportado en la literatura.

A continuación, se muestra el espectro RMN ^1H de **dBnPpIX**. En el cual se destaca el multiplete observado a 7.03 ppm y el singulete a 5.04 ppm ya que nos indican que la esterificación de **dNaPpIX** se ha llevado a cabo. El multiplete observado a 7.03 ppm corresponde al fenilo proveniente del alcohol bencílico e integra para 10 protones indicando que tenemos dos sustituyentes fenilo en nuestra estructura.

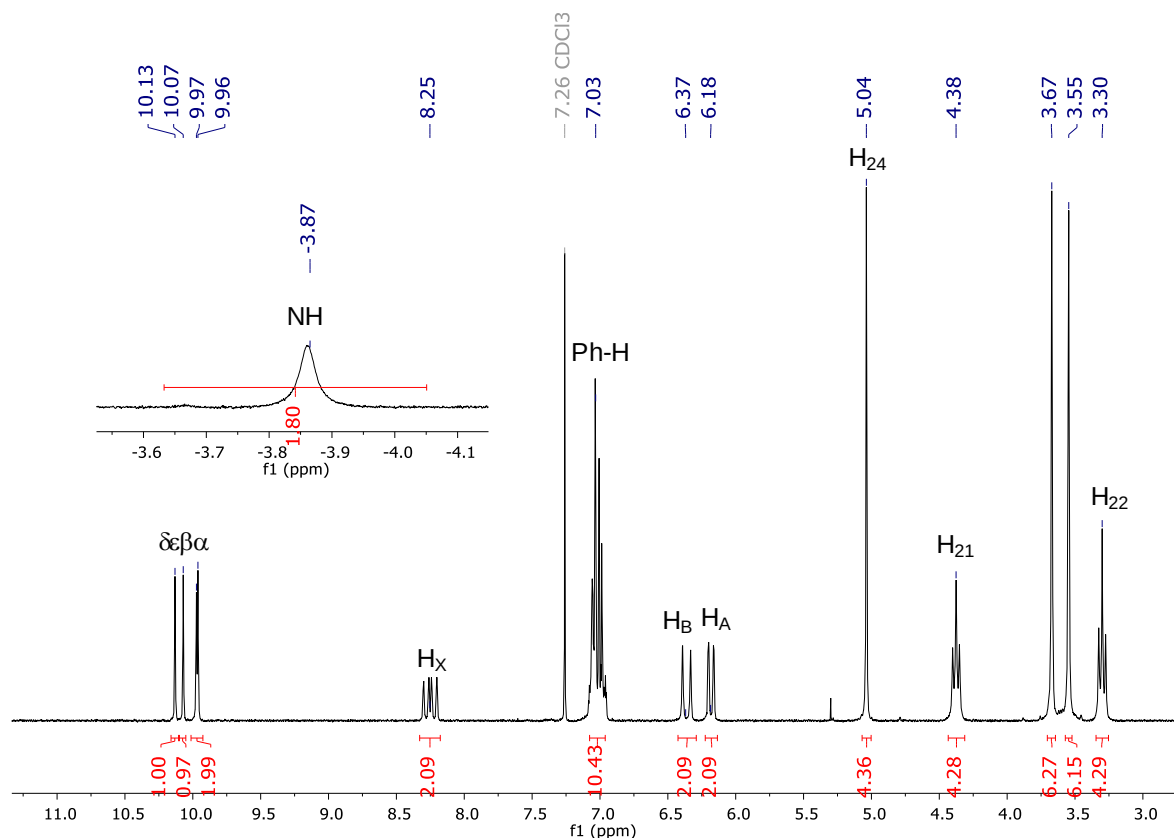


Figura 26. Espectro RMN ^1H de **dBnPpIX** en CDCl_3 , la asignación es realizada de acuerdo a la Figura 25.

Las porfirinas **dMePpIX** y **dBnPpIX** fueron utilizadas como material de partida para sintetizar las clorinas, **dMeCloA**, **dMeCloB**, **dBnCloA** y **dBnCloB** mostradas en la **Figura 27**.

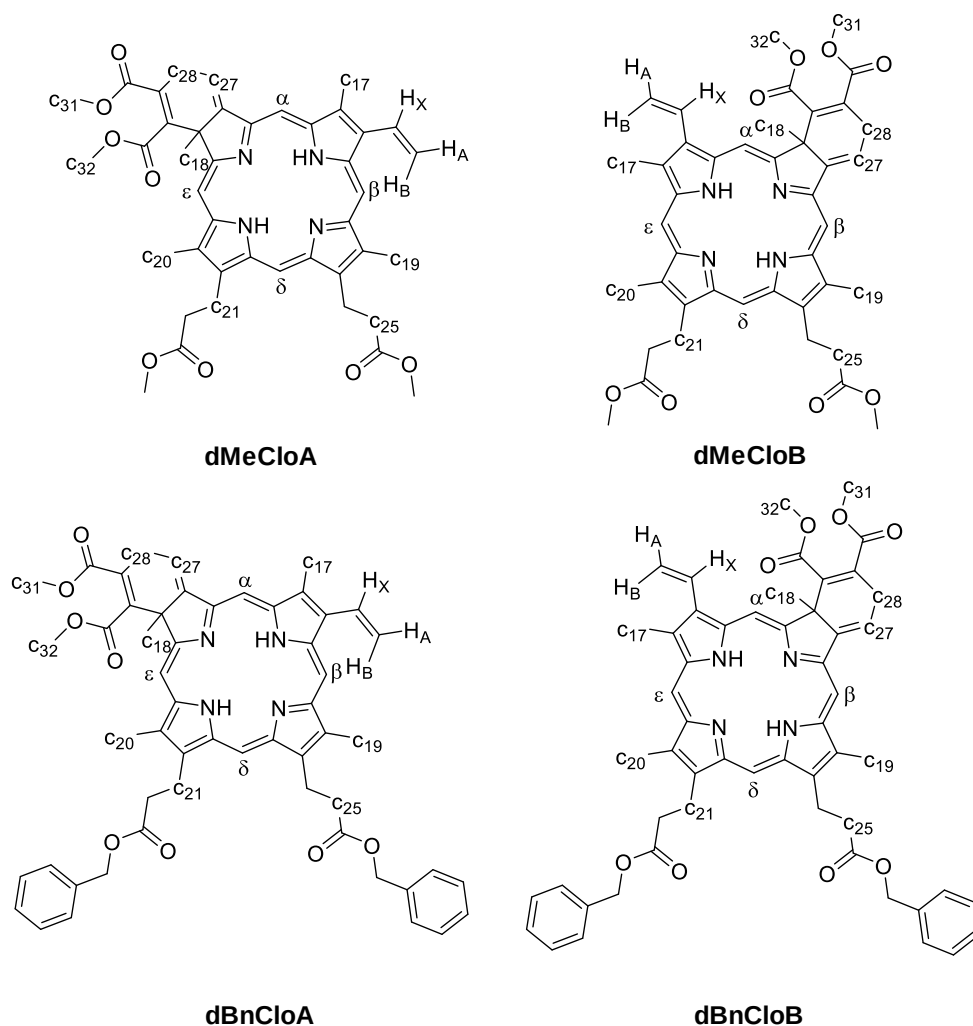


Figura 27. Estructuras de las clorinas sintetizadas.

La reacción entre la porfirina (**dMePpIX** o **dBnPpIX**) y el acetilenodicarboxilato de dimetilo (**DMAD**) conducen a una reacción de Diels – Alder (cicloadición [4+2]). Durante la reacción electrocíclica, seis electrones π se reorganizan para formar un producto cíclico de seis miembros.¹¹¹ Estos seis electrones son provenientes de 4 electrones π de un dieno conjugado (**dMePpIX** o **dBnPpIX**) y 2 electrones π de un dienófilo (**DMAD**) que puede ser un alqueno o alquino.¹¹²

Las porfirinas usadas para preparar las clorinas presentan dos sistemas de 4 electrones π como se observa en la **Figura 28**.

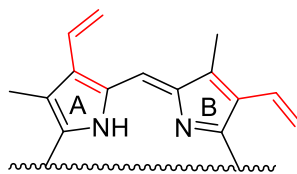


Figura 28. Representación del sistema “dieno” presente en la porfirina. Se dibuja media porfirina para una mejor visualización

Por esta razón, al hacer reaccionar la correspondiente porfirina con el dienófilo se obtiene una mezcla de dos isómeros denominados **dMeCloAB** o **dBnCloAB**. La nomenclatura **A** o **B** es debido a que las porfirinas y sus derivados presentan 4 anillos de pirroles los cuales se nombran como **A**, **B**, **C** y **D** (ver **Sección 2.2**).

La **Figura 29** muestra el espectro RMN ^1H de la mezcla **dMeCloAB** en el cual se observan que todas las señales están duplicadas. Las más sobresalientes son los singuletes anchos a -2.60 y -2.48 ppm que integran para 2 protones cada una y son asignadas a los protones del anillo pirrol (NH) y los 8 singuletes que se encuentran de 9.11 a 9.82 ppm asignados a los protones de los puentes metino que unen los cuatro anillos pirrol. Esto nos indica que efectivamente tenemos una mezcla de isómeros. Además, se destaca la aparición de la señal observada a 7.40 ppm ya que, es la nueva señal formada perteneciente al anillo producto de la cicloadición

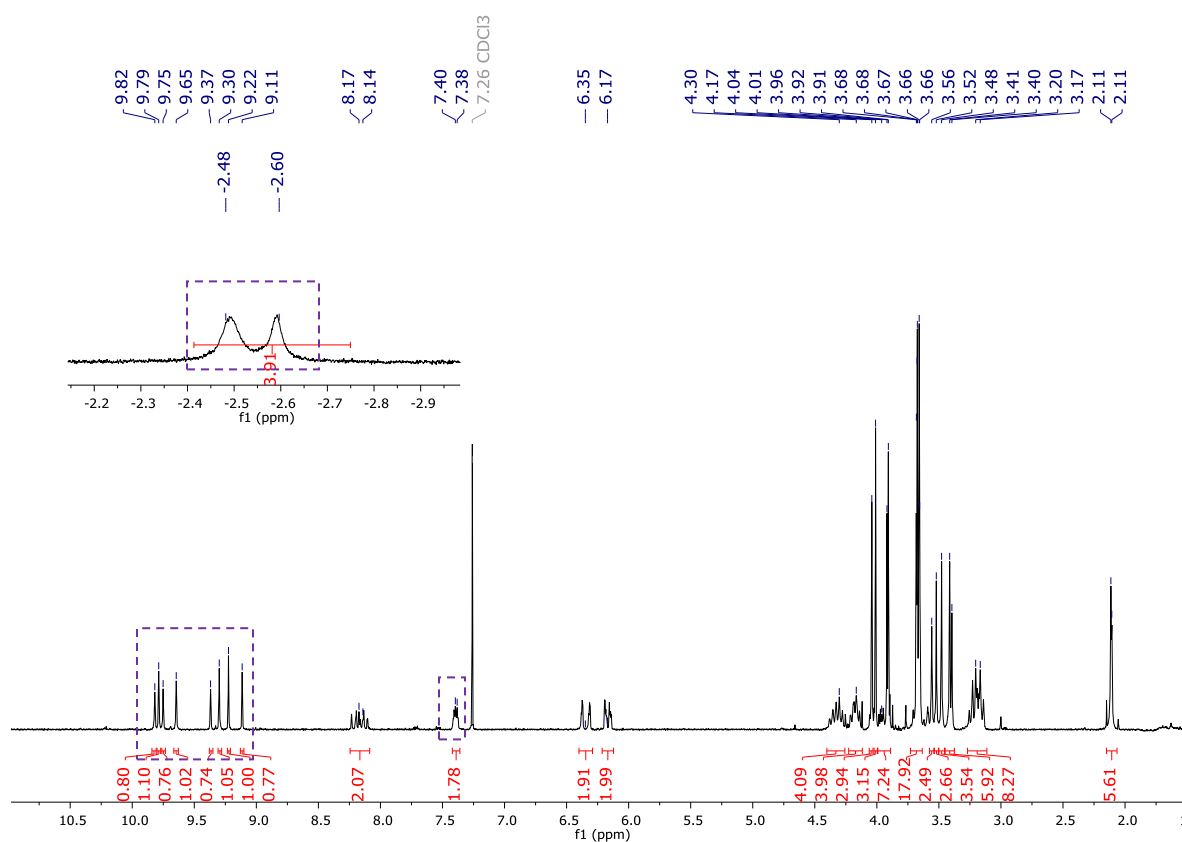


Figura 29. Espectro RMN ^1H de la mezcla **dMeCloAB** en CDCl_3 .

La presencia de los isómeros **A** y **B** también se logró confirmar por HPLC como se muestra en la **Figura 30**.

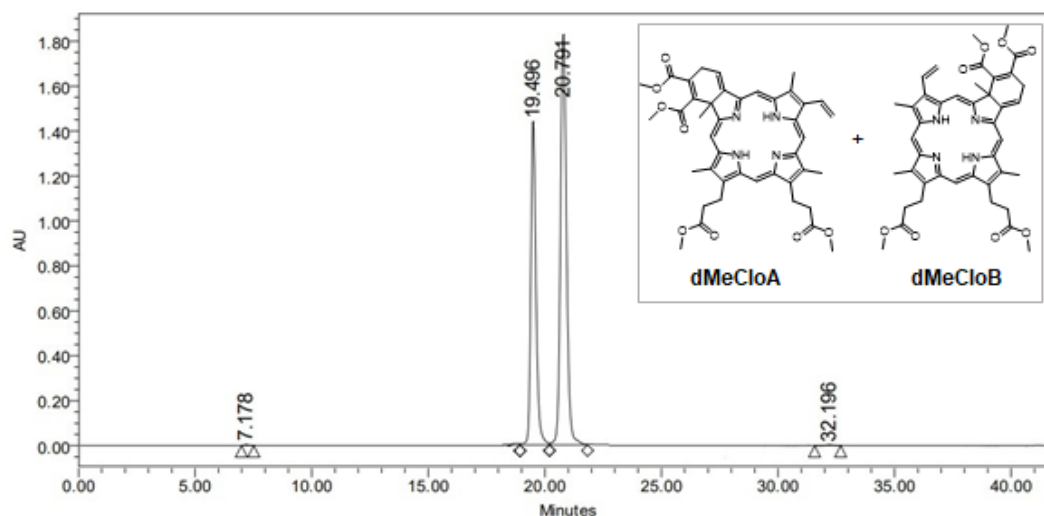


Figura 30. Cromatograma HPLC de la mezcla **dMeCloAB**.

Para separar el isómero **A** y el isómero **B** se usaron tres metodologías diferentes: HPLC preparativa, cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía en columna utilizando gel de sílice de malla 230/400 y una mezcla de diclorometano, *n*-hexano, acetato de etilo (8/1.2/0.8) como eluyente.

Los tres métodos empleados funcionaron de manera correcta, pero por HPLC y por cromatografía en capa fina se obtuvieron rendimientos bajos (no superaban el 6%) mientras que por cromatografía en columna se logró obtener un 21% de **dMeCloA** y un 68% de **dMeCloB**. El bajo rendimiento del isómero **dMeCloA** podría deberse a que este, se descompone a medida que pasa el tiempo en la columna.

Para determinar a cuál isómero correspondía a la fracción con el R_f más alto o bajo fue necesario acudir a los espectros NOESY. La **Figura 31** muestra los principales efectos que se deberían observar en ambos productos si presentan un efecto nuclear overhauser (NOE).

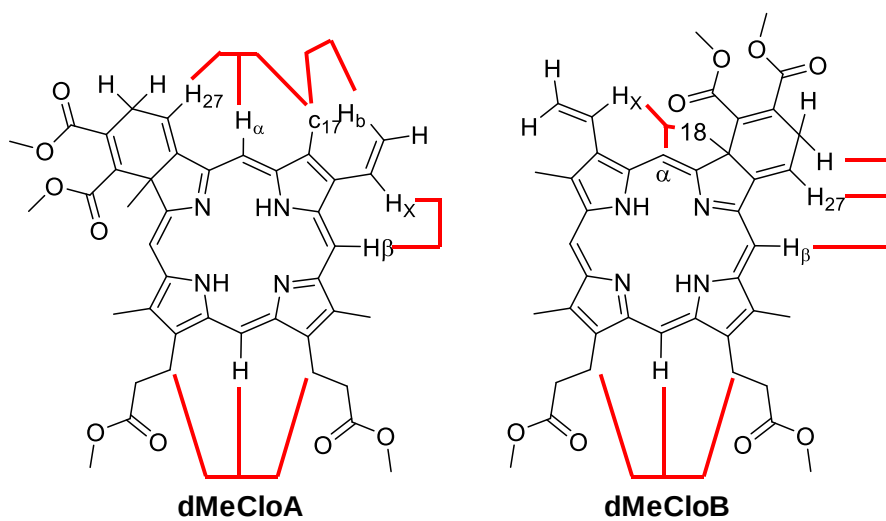


Figura 31. Principales efectos NOE en los compuestos **dMeCloA** y **dMeCloB**.

La señal observada como un doble de dobles asignado a H_X es una señal inequívoca de gran importancia ya que, el efecto NOE que presenta el H_X con el H_β del puente metino en el compuesto **dMeCloA** (Figura 32) es un efecto único de este isómero.

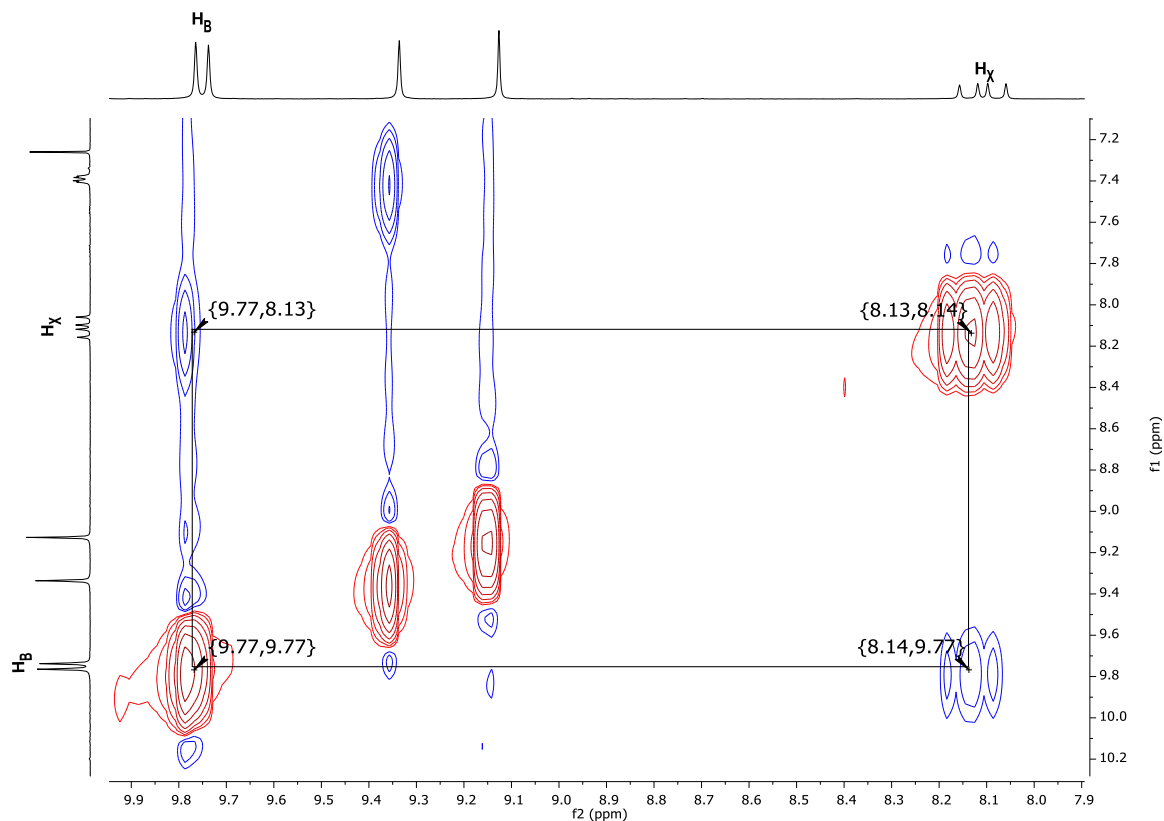


Figura 32. Efecto NOE observado en el isómero **dMeCloA**

Mientras que, en el isómero **dMeCloB**, el efecto NOE entre H_X y el H del puente metino H_α es confirmado por la interacción de H_α con H_{18} como se muestra en la Figura 33.

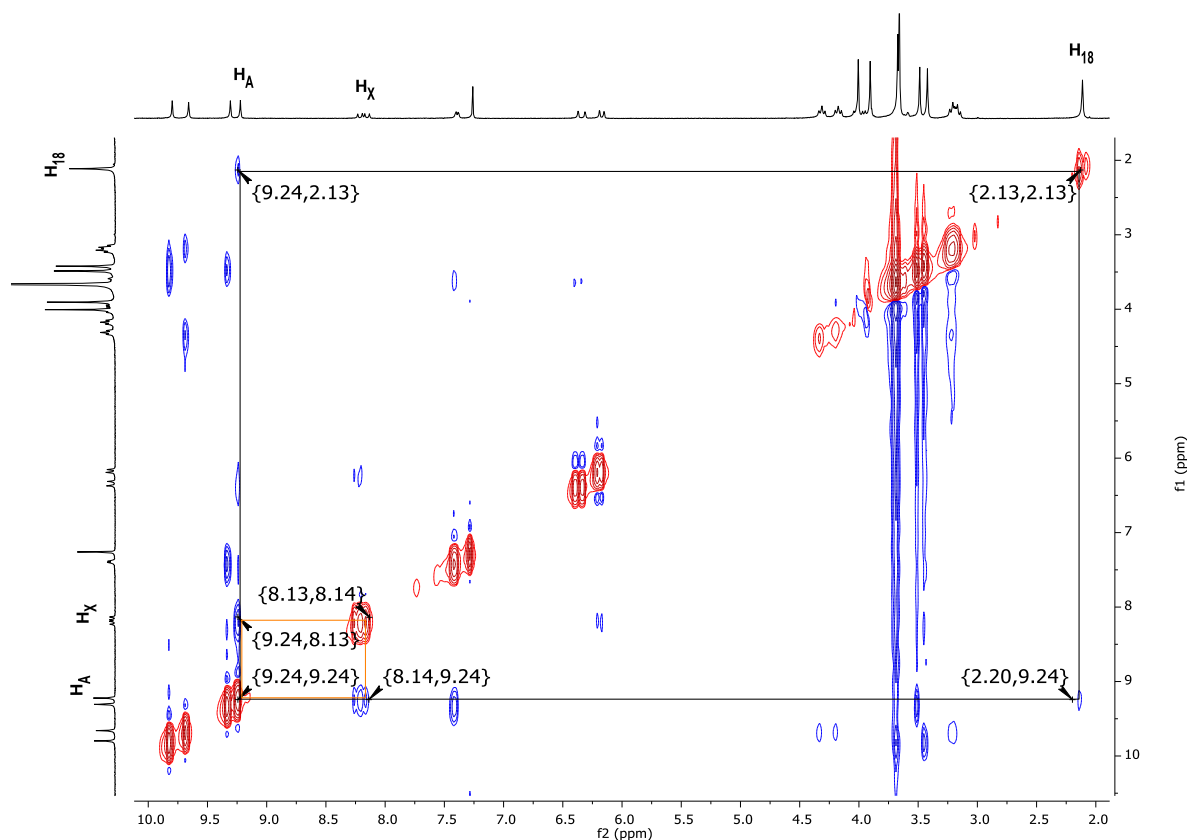


Figura 33. Espectro NOESY de **dMeCloB**

Por lo tanto, podemos concluir que el compuesto más polar o con un menor R_f es **dMeCloA** y el compuesto menos polar o con un alto R_f es **dMeCloB**.

Además, la estructura del isómero **dMeCloB** se confirmó por cristalografía por difracción de rayos X (**Figura 34**). Los parámetros cristalográficos se muestran en la **Tabla 1**. El compuesto **dMeCloB** cristalizó en un sistema ortorrómbico con grupo espacial $Fdd2$.

Tabla 1. Parámetros cristalográficos para **dMeCloB**

Compuesto	dMeCloB
Fórmula empírica	C ₄₂ H ₄₄ N ₄ O ₈
Peso molecular (g/mol)	732.81
Temperatura (K)	101
Sistema cristalino	Ortorrómbico
Grupo espacial	$Fdd2$
a (Å)	27.1094(7)
b (Å)	73.7996(18)
c (Å)	7.4298(2)
α (°)	90
β (°)	90
γ (°)	90
Volumen (Å³)	14864.5(7)
Z	16

Densidad (mg×m ³)	1.310
Coefficiente de absorción (mm ⁻¹)	0.746
F(000)	6208
Rango θ (°)	2.39 a 74.35
Reflexiones colectadas	84611
Reflexiones independiente	[R(int) = 0.0961]
Datos/Restricciones/Parámetros	6876/103/548
Calidad de ajuste de F ²	1.076
Índice R final	0.1050

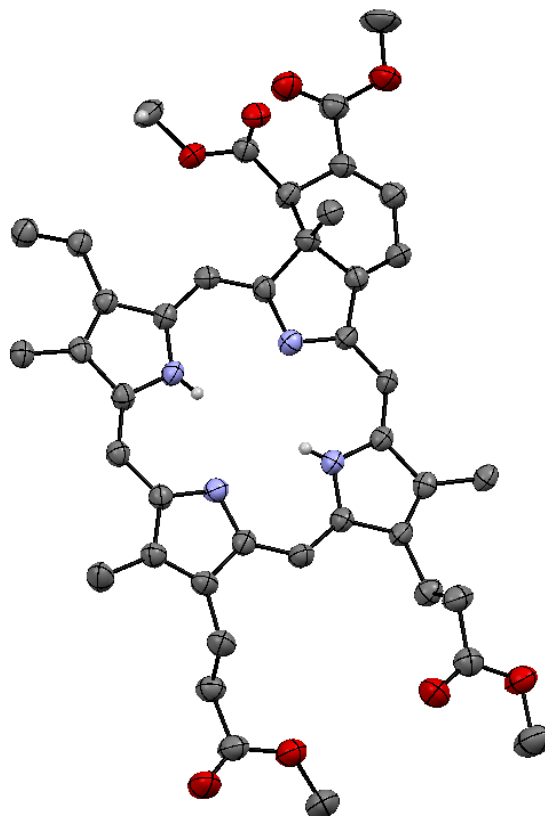


Figura 34. Diagrama ORTEP de **dMeCloB** al 40% de probabilidad (los hidrógenos han sido omitidos para una mejor visualización) excepto los hidrógenos de los enlaces NH.

Finalmente, la pureza de cada isómero fue confirmada mediante la técnica HPLC, donde se observa que cada isómero fue separado apropiadamente.

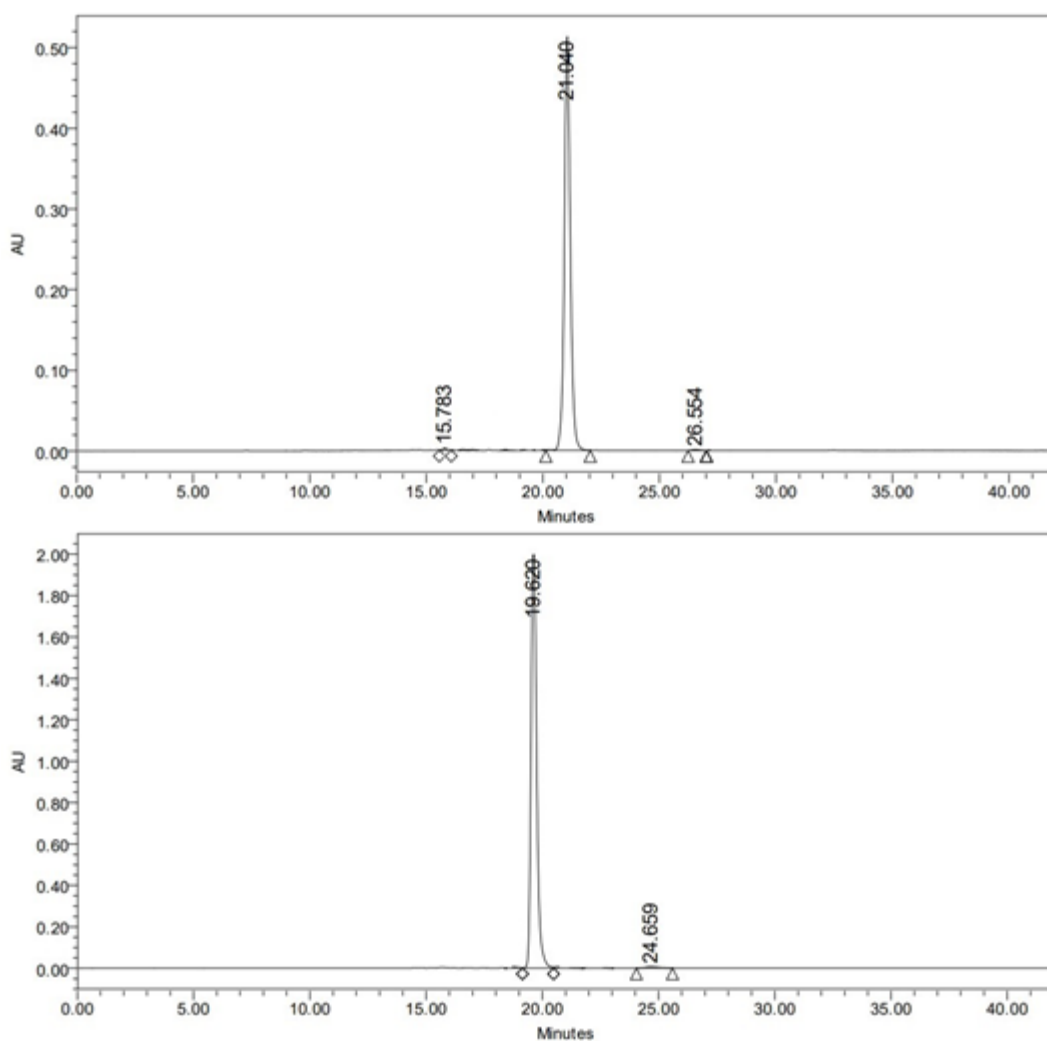


Figura 35. Cromatograma HPLC de los compuestos **dMeCloA** (arriba) y **dMeCloB** (abajo).

Cabe resaltar que las clorinas derivadas de la porfirina **dBnPpIX** también se lograron obtener usando la misma ruta sintética e igual metodología de purificación a las clorinas **dMeCloA** y **dMeCloB**. Sin embargo, los rendimientos para las clorinas derivadas de la porfirina **dBnPpIX** fueron del 19% y 34% para **dBnCloA** y **dBnCloB** respectivamente. Los espectros de masas, IR, RMN y HPLC se muestran en la sección de **Anexos**.

Los compuestos **dMePpIX**, **dBnPpIX**, **dMeCloAB**, **dMeCloA** y **dMeCloB** se usaron como ligantes para hacerse reaccionar con el precursor **Ru₃(CO)₁₂**. En todos los casos se obtuvieron complejos con una geometría pirámide de base cuadrada, donde el quinto ligante era un carbonilo (CO) en posición axial como se muestra en la **Figura 36**.

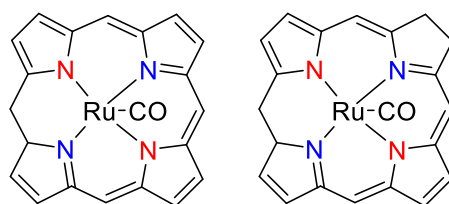
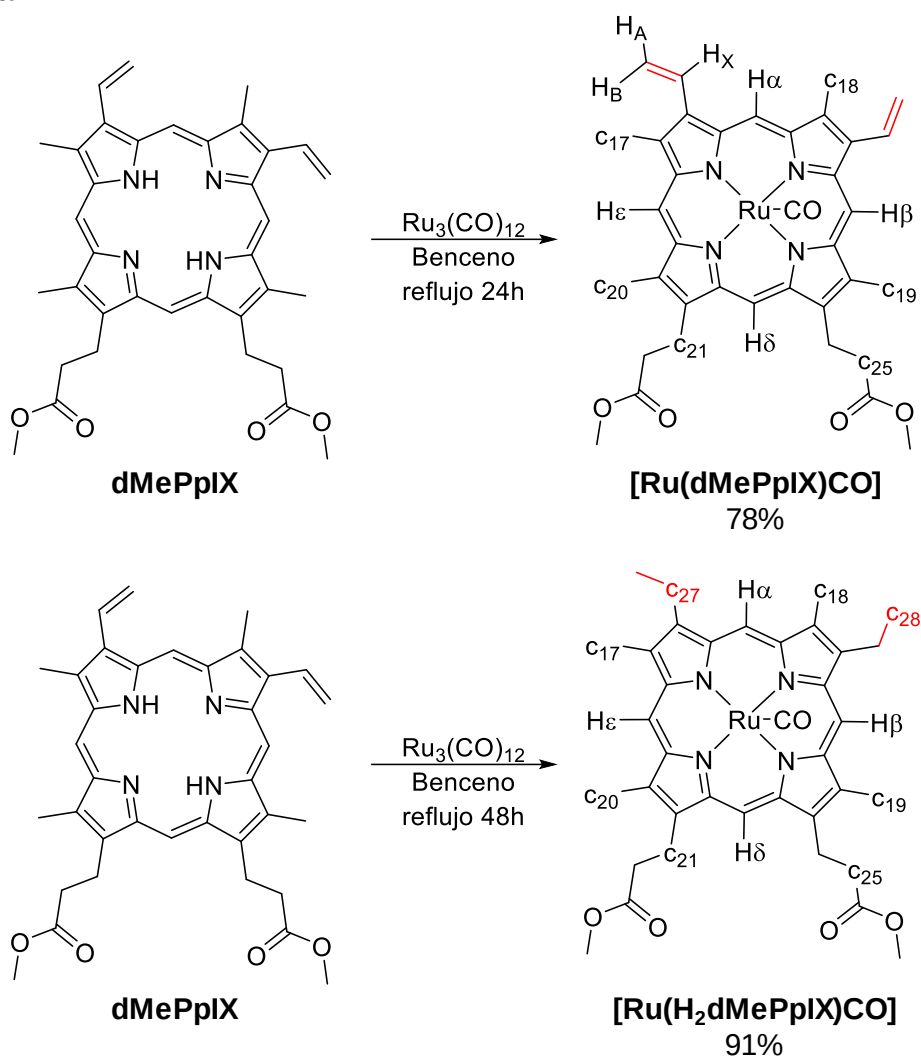


Figura 36. Estructura de los complejos obtenidos al usar como ligante porfirinas (izquierda) o clorinas (derecha).

Durante la obtención de la metaloporfirina **[Ru(dMePpIX)CO]** encontramos que, la **dMePpIX** se consume totalmente en 48 horas de reacción como se muestra en el **Esquema 2**.



Esquema 2. Metalación de **dMePpIX**.

Después de 48 horas de reacción, el producto de reacción fue purificado mediante cromatografía en columna empaquetada con alúmina neutra y usando *n*-hexano/acetona (7:3) como fase móvil, obteniendo 33 mg (91% de rendimiento) de un sólido color rosa. Al caracterizar el producto obtenido nos dimos cuenta que el producto final obtenido no correspondía con la metaloporfirina planteada inicialmente, ya que mediante el RMN ¹H (**Figura 37**) se observa la ausencia de la

señal de la doble ligadura terminal del $-\text{CH}=\text{CH}_2$ y aparecen 2 nuevas señales, un triplete a 1.88 ppm ($^3J = 7.81$ Hz) que integra para 6 protones y un cuarteto a 4.02 ppm ($^3J = 7.49$ Hz) que integra para 4 protones, las cuales corresponden a $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$. Esto indica que el doble enlace se ha hidrogenado, posiblemente, debido a que durante la reacción de metalación pueden formarse especies rutenio-hidruro¹¹³ y esta especie actuó como un catalizador hidrogenando la doble ligadura. En trabajos reportados se ha encontrado que especies de rutenio-hidruro pueden hidrogenar enlaces $\text{C}=\text{C}$ de la porfirina para obtener como producto una metaloclorina.^{114,115}

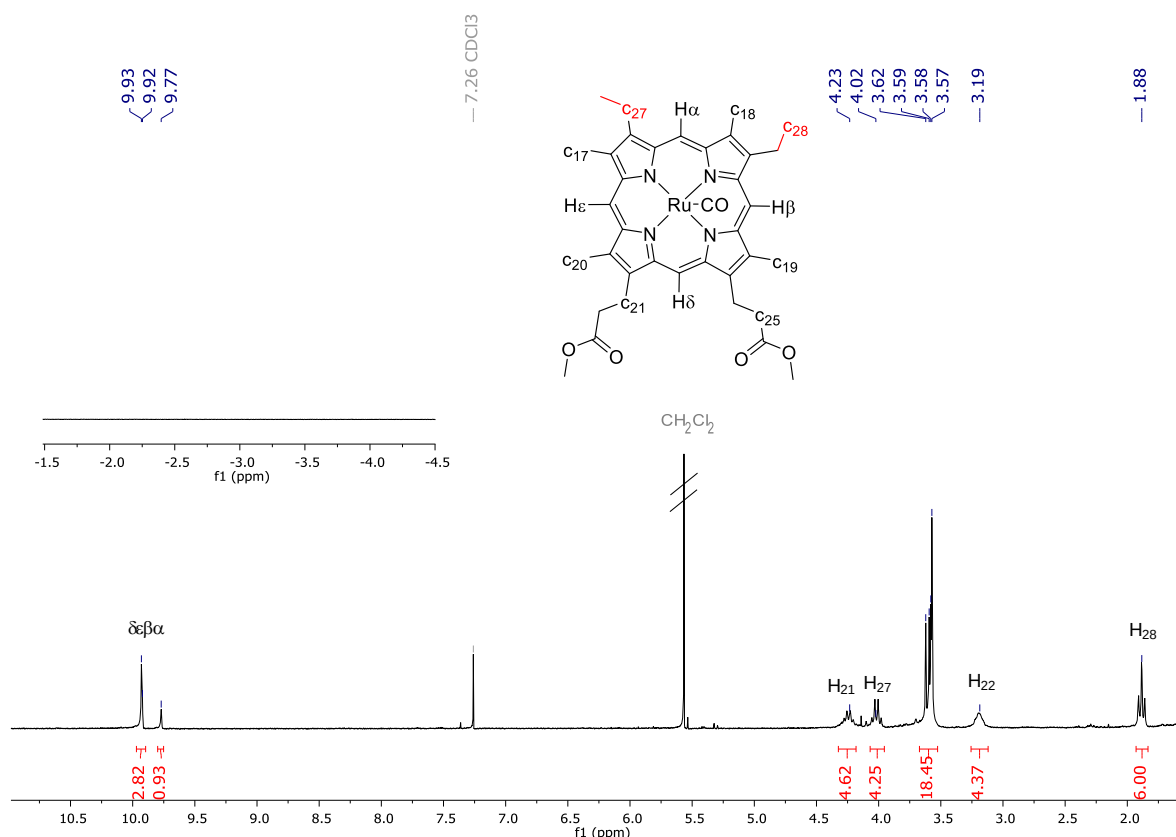


Figura 37. Espectro RMN ^1H de $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{dMePPIX})\text{CO}]$ en CDCl_3 . La inserción mostrada en el espectro corresponde a la región donde se observan los protones del enlace NH.

Por estas razones, decidimos variar el tiempo de reacción. Se encontró que a 24 horas de reflujo tanto la porfirina de partida como el precursor de rutenio de partida no se han consumido al 100% (seguimiento por TLC). Entonces, pasadas 24 horas de reacción realizamos una columna cromatografía empaquetada con alúmina neutra usando *n*-hexano/acetona (7:3) como fase móvil. Se logró, recuperar la porfirina sin reaccionar y el complejo aislado correspondía al producto deseado. Sin embargo, el rendimiento del producto fue menor (78%) en comparación con el complejo hidrogenado (91%).

Se lograron obtener cristales adecuados para la difracción de rayos X y así confirmar que la estructura que estábamos obteniendo a 48 horas de reacción correspondía al complejo denominado como $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{dMePPIX})\text{CO}]$. La **Tabla 2**

muestra los datos cristalográficos del compuesto **[Ru(H₂dMePpIX)CO]** y la **Figura 38** muestra el diagrama ORTEP de los complejo **[Ru(dMePpIX)CO]** y **[Ru(H₂dMePpIX)CO]** donde se logra observar que en el complejo **[Ru(dMePpIX)CO]** el carbono de la doble ligadura presenta una hibridación C(sp²), mientras que, en el carbono de la doble ligadura el complejo **[Ru(H₂dMePpIX)CO]** presenta una hibridación C(sp³).

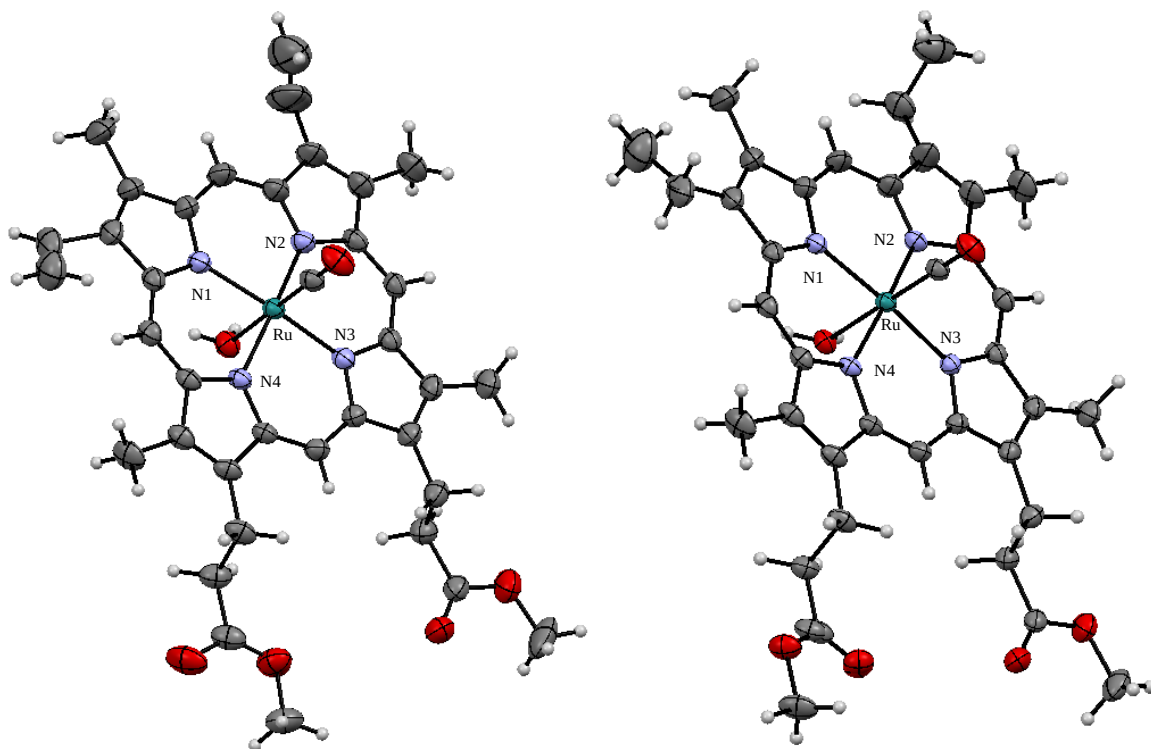


Figura 38. Diagrama ORTEP para **[Ru(dMePpIX)(H₂O)CO]** (izquierda) y **[Ru(H₂dMePpIX)(H₂O)CO]** (derecha) al 40% de probabilidad

Tabla 2. Parámetros cristalográficos para **[Ru(H₂dMePpIX)(H₂O)CO]**

Compuesto	[Ru(H₂dMePpIX)(H₂O)CO]
Fórmula empírica	C ₃₇ H ₄₂ N ₄ O ₆ Ru
Peso molecular (g/mol)	736
Temperatura (K)	150
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	C2/c
a (Å)	22.7333(9)
b (Å)	13.0227(5)
c (Å)	26.6688(14)
α (°)	90
β (°)	114.5284(10)
γ (°)	90
Volumen (Å ³)	7182.8(6)
Z	4
Densidad (mg×m ³)	1.447

Coefficiente de absorción (mm⁻¹)	0.562
F(000)	3240
Rango θ (°)	2.20 a 32.01
Reflexiones colectadas	152577
Reflexiones independiente	[R(int) = 0.0270]
Datos/Restricciones/Parámetros	11919/203/551
Calidad de ajuste de F²	1.182
Índice R final	0.0528

Como se observa en la **Figura 38** el compuesto ambos compuestos cristalizan con una molécula de agua, formando una estructura octaédrica, donde, el ángulo de enlace para H₂O-Ru-CO es de 179.78°, muy similar al ángulo de 179.04° observado en el compuesto **[Ru(dMePpIX)CO]**. La distancia de enlace del C(sp²-sp³) para **[Ru(H₂dMePpIX)(H₂O)CO]** es de 1.506 Å lo cual concuerda con la distancia de enlace C(sp²-sp³) reportado en la literatura,^{116,117} mientras que la distancia de enlace de C(sp²-sp²) para el compuesto **[Ru(dMePpIX)CO]** fue de 1.299 Å.

A continuación, se observa que, en el espectro RMN ¹H del complejo **[Ru(dMePpIX)CO]** a 24 horas de reacción mostrado en la **Figura 39** se destaca la desaparición del singulete observado a -3.84 ppm en el ligante (ver **Anexo 1**) y se mantienen las señales pertenecientes a las dobles ligaduras.

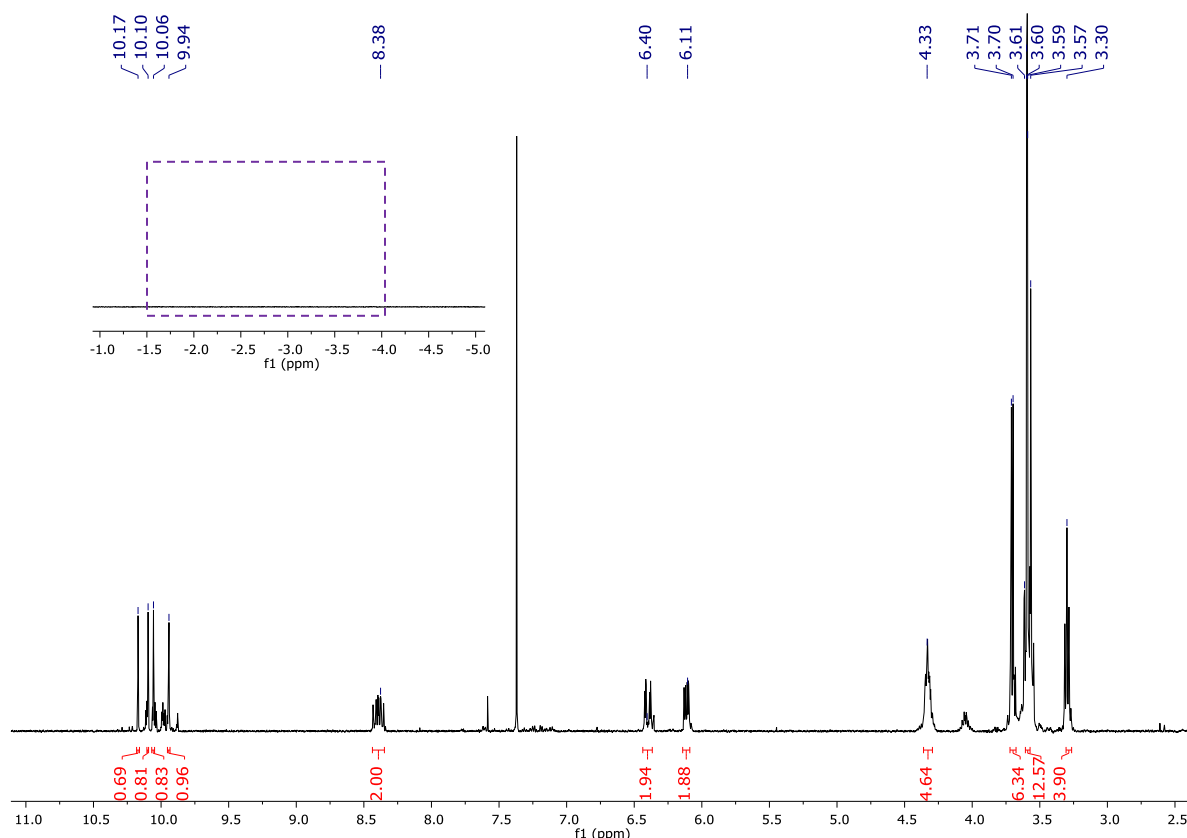


Figura 39. Espectro RMN ¹H de **[Ru(dMePpIX)CO]** en CD₃CN.

Por lo tanto, decidimos que el tiempo de reacción para metalar los ligantes sería un reflujo en benceno de 24 horas.

La estructura del complejo **[Ru(dBnPpIX)CO]** se logró confirmar por cristalografía de rayos-X. Cabe mencionar que los parámetros de difracción para el complejo **[Ru(dBnPpIX)CO]** no son de muy buena calidad. Sin embargo, se muestra el diagrama ORTEP para confirmar que la estructura propuesta corresponde a la planteada. Las estructuras de ambos complejos muestran coordinada una molécula de H₂O, la cual podría ser proveniente de los disolventes usados. Además, se ha observado en la literatura que en metaloporfirinas de rutenio, moléculas de agua, metanol y etanol pueden unirse débilmente en posición *trans* al CO.^{114,118,119} La **Figura 40** muestra los diagramas ORTEP de las estructuras difractadas y los datos cristalográficos se muestran en la **Tabla 3**.

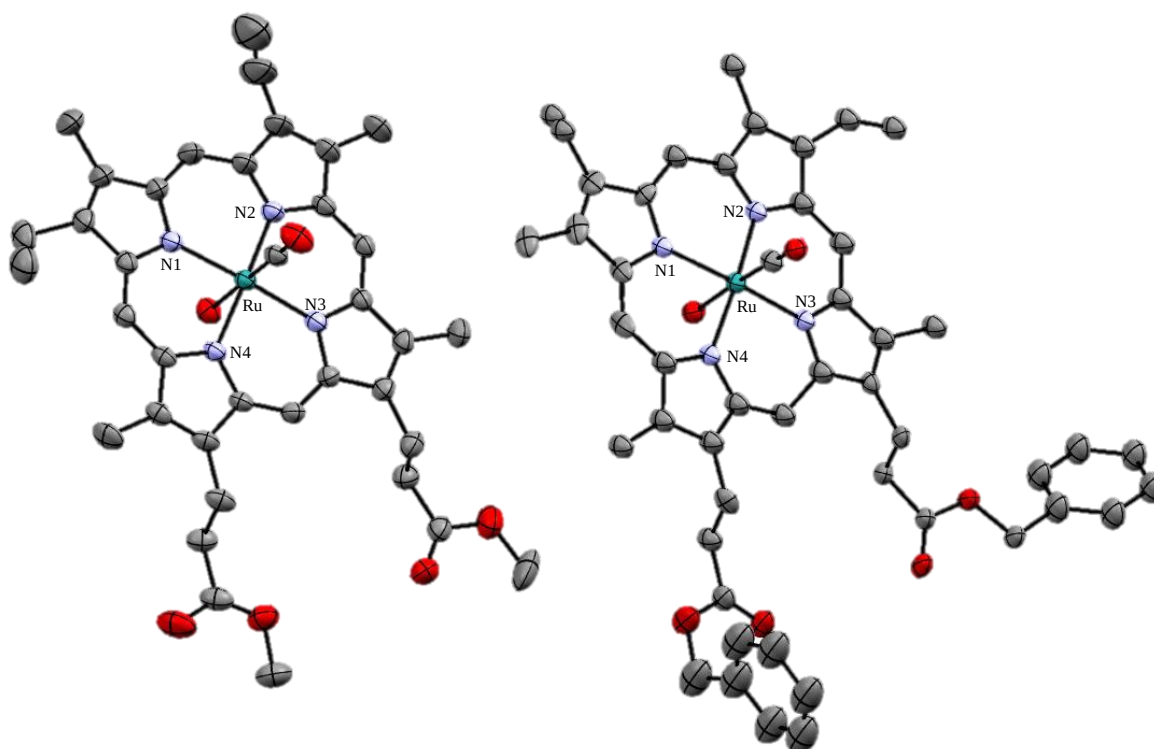


Figura 40. Diagrama ORTEP de los compuestos **[Ru(dMePpIX)(H₂O)CO]** (izquierda) y **[Ru(dBnPpIX)(H₂O)CO]** (derecha) al 40% de probabilidad (los hidrógenos han sido omitidos para una mejor visualización).

Se puede observar que los ángulos entre los átomos H₂O-Ru-CO son de 179.04 y 177.96° para los complejos **[Ru(dMePpIX)(H₂O)CO]** y **[Ru(dBnPpIX)(H₂O)CO]** respectivamente. Además, los ángulos entre los átomos de nitrógeno de la porfina y el átomo de rutenio son de 173.72 y 173.83° para el complejo **[Ru(dMePpIX)(H₂O)CO]** y 173.54 y 172.93° para el complejo **[Ru(dBnPpIX)(H₂O)CO]**, lo que indica que ambas estructuras presentan una geometría octaédrica ligeramente distorsionada.

Se observa que la distancia de enlace entre Ru-CO y Ru-OH₂ es de 1.782(5) y 2.224(4) Å para el complejo **[Ru(dMePpIX)(H₂O)CO]** y de 1.790(2) y 2.230(2) Å

para el complejo **[Ru(dBnPpIX)(H₂O)CO]** respectivamente. El enlace Ru-OH₂ observado en nuestro estudio es más largado que las distancias de enlace Ru-OH₂ observadas comúnmente que es de aproximadamente 2.00 Å,¹²⁰ lo cual podría ser debido a una fuerte influencia *trans* del CO.

Tabla 3. Parámetros cristalográficos para **[Ru(dMePpIX)(H₂O)CO]** y **[Ru(dBnPpIX)(H₂O)CO]**.

Compuesto	[Ru(dMePpIX)CO]	[Ru(dBnPpIX)CO]
Fórmula empírica	C ₃₇ H ₃₈ N ₄ O ₆ Ru	C ₄₉ H ₄₆ N ₄ O ₆ Ru
Peso molecular (g/mol)	736	888
Temperatura (K)	298	130
Sistema cristalino	Monoclinico	Triclinico
Grupo espacial	C2/c	P-1
a (Å)	22.896(3)	11.8979(6)
b (Å)	13.2913(14)	13.5602(6)
c (Å)	26.651(3)	15.0541(8)
α (Å)	90	77.546(4)
β (Å)	114.532(4)	81.241(4)
γ (Å)	90	69.816(4)
Volumen (Å³)	7378.3(15)	2218.0(2)
Z	8	2
Densidad (mg×m³)	1.395	1.330
Coefficiente de absorción (mm⁻¹)	0.547	0.406
F(000)	3192	920
Rango θ (°)	2.74 a 30.18	-
Reflexiones colectadas	132312	25183
Reflexiones independiente	[R(int) = 0.1318]	[R(int) = 0.0367]
Datos/Restricciones/Parámetros	10693/205/567	8117/200/518
Calidad de ajuste de F²	1.018	1.121
Índice R final	0.0717	0.0819

Para metalar los compuestos, **dMeCloA** y **dMeCloB** realizamos dos ensayos. El primer ensayo consistió en hacer reaccionar la mezcla **dMeCloAB** con el precursor metálico **Ru₃(CO)₁₂** para formar la mezcla de metaloclorinas y luego separar cada una. Por desgracia el rendimiento que se obtuvo fue el 12%, lo cual indicaba que al intentar separar cada isómero íbamos a obtener trazas de cada uno. Por lo tanto, probamos una segunda metodología, la cual consistió en hacer reaccionar cada isómero puro, es decir el compuesto **dMeCloA** o **dMeCloB** con el precursor metálico, donde finalmente logramos obtener un mejor rendimiento, siendo del 13 y 16% respectivamente.

La estructura de los complejos obtenidos se muestra en la **Figura 41**. Cabe resaltar que la pureza de todos los ligantes y complejos se midieron mediante HPLC (ver **Anexos 41-50**). En el espectro RMN ¹H de todas las estructuras metálicas se destaca la desaparición de la señal correspondiente a los protones del NH, lo cual nos indica que la metalación se ha llevado a cabo de manera adecuada. Además, en los espectros RMN ¹³C se observa una señal a

aproximadamente 207 ppm para los compuestos **[Ru(dMePpIX)CO]** y **[Ru(dBnPpIX)CO]**, la cual es asignada al carbono del enlace Ru–CO (tomado en CD₃CN).

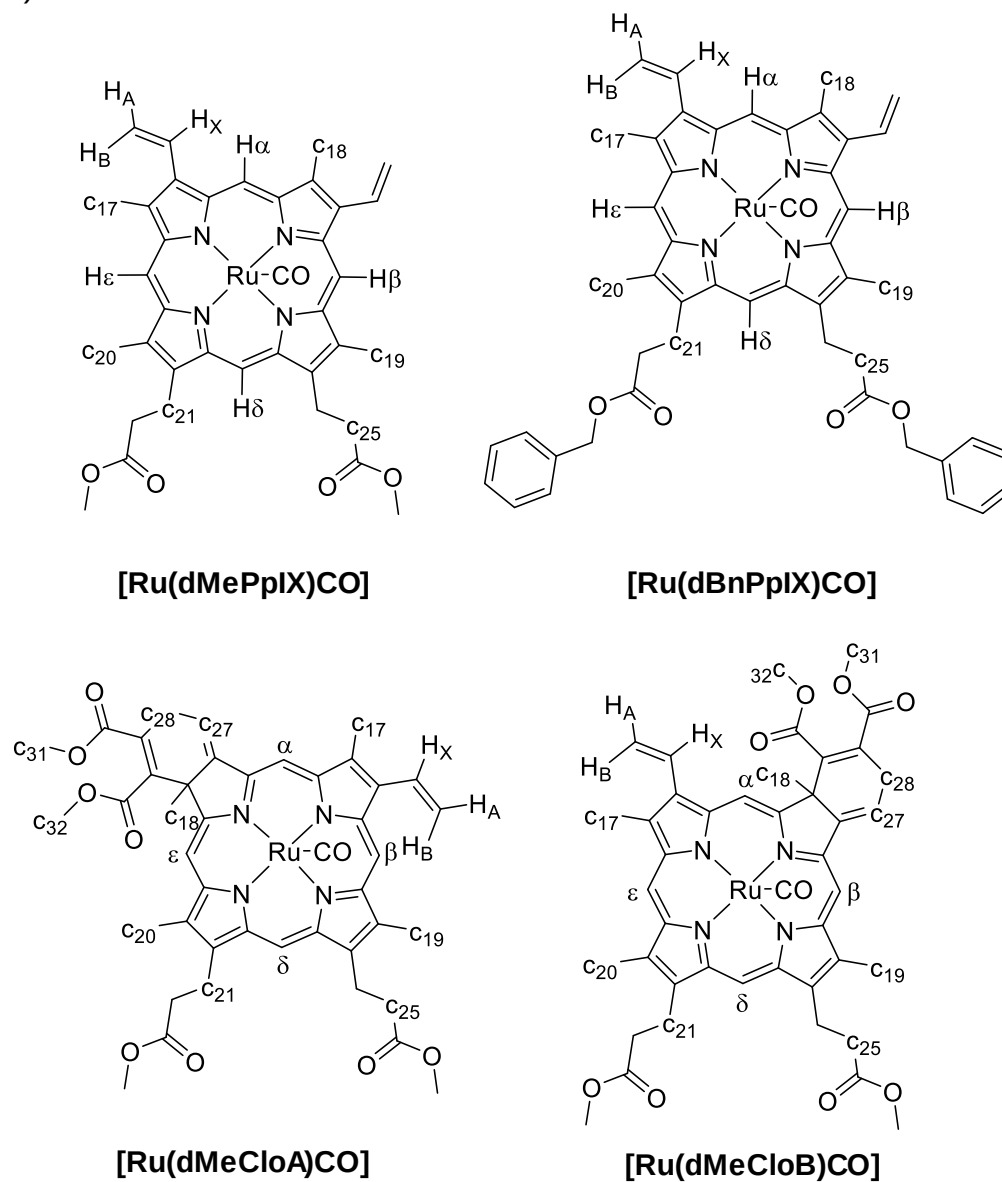


Figura 41. Estructura y enumeración de los complejos de rutenio obtenidos.

Mediante la espectroscopía infrarroja se logró observar la presencia del CO metálico como se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Frecuencias de vibración del enlace Ru–CO obtenido por ATR.

Compuesto	ν -Ru–CO (cm ⁻¹)
[Ru(dMePpIX)CO]	1914
[Ru(dBnPpIX)CO]	1915
[Ru(dMeCloA)CO]	1927
[Ru(dMeCloB)CO]	1923

En los **Anexos 51-55** se muestran los espectros IR obtenidos. En todos los casos se observa una banda intensa entre 1914 y 1927 cm^{-1} , la cual es típica de la vibración del enlace Ru–CO. Además, es consistente con trabajos reportados en la literatura.¹²¹

5.2 Absorción electrónica

Los espectros de absorción UV-Vis de los ligantes y complejos se midieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a 37 °C, la concentración para todas las mediciones fue de 1×10^{-5} M. La **Tabla 5** muestra las absorciones electrónicas obtenidas para todos los compuestos.

Tabla 5. Propiedades espectrofotométricas obtenidas de los espectros de absorción UV-Vis en DMSO, 1×10^{-5} M a 37 °C.

Compuesto	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} \times 10^{-5}$)
dMePpIX	406(80199), 506(2691), 540(2138), 576(1318), 630(933)
[Ru(dMePpIX)CO]	404(57344), 524(12023), 558(18621)
dBnPpIX	408(83174), 506(7413), 540(5888), 576(3631), 630(2570)
[Ru(dBnPpIX)CO]	402(57544), 524(8913), 558(12882)
dMeCloA	406(83176), 502(11220), 536(8710), 608(3981), 666(32359)
[Ru(dMeCloA)CO]	406(67608), 536(6456), 568(8710), 606(17378)
dMeCloB	404(107152), 500(11749), 534(8511), 608(4169), 666(35481)
[Ru(dMeCloB)CO]	406(42658), 534(4571), 568(6918), 606(10471)
dBnCloA	406(102329), 502(9332), 536(7413), 608(3981), 666(26303)
dBnCloB	406(97724), 500(12589), 534(8710), 608(3981), 666(38904)

En los espectros observados en la **Figura 42** se aprecia que todos los compuestos tienen una banda de absorción intensa alrededor de 400 nm la cual es llamada banda Soret e indica transiciones tipo $\pi-\pi^*$.¹²² Las 4 bandas seguidas de menor absorción se denominan bandas Q (Q_I , Q_{II} , Q_{III} y Q_{IV}) y son típicas porfirinas y clorinas. En las porfirinas **dMePpIX** y **dBnPpIX**, las 4 bandas Q observadas tienen un decrecimiento de mayor a menor valor de absorbancia ($Q_I > Q_{II} > Q_{III} > Q_{IV}$). En porfirinas, la banda Q_{IV} normalmente es observada entre 630-635 nm y es la de menor absorción¹²³ siendo esto consistente con lo observado en la **Figura 42** (arriba). En las clorinas (**dMeCloA**, **dMeCloB**, **dBnCloA** y **dBnCloB**) también se observan 4 bandas Q, pero en este caso, la banda Q_{IV} experimentan un desplazamiento batocrómico acompañado de un efecto hipercrómico. Normalmente, las clorinas se diferencian de las porfirinas porque la banda Q_{IV} se observa entre 660-670 nm.^{124,125} En esta investigación, la banda Q_{IV} se observó a 666 nm para todas las clorinas como se muestra en la **Figura 42** (abajo).

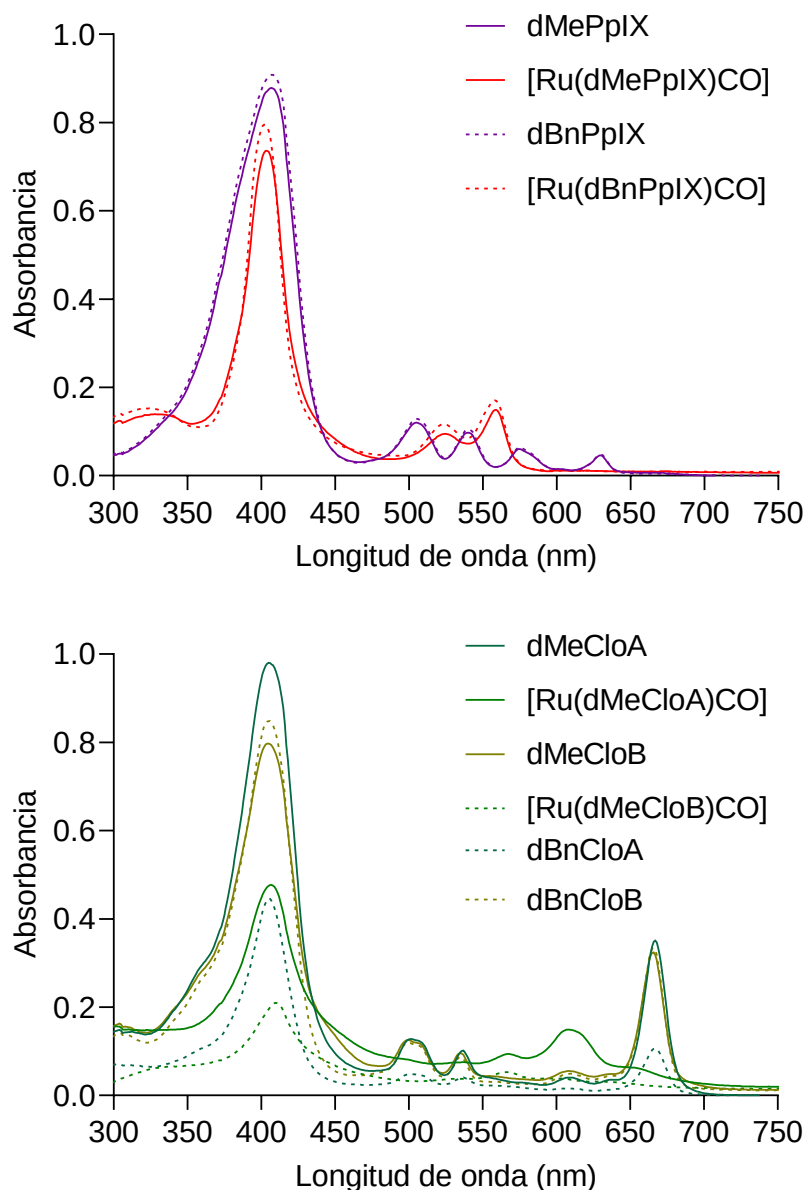


Figura 42. Espectros de absorción de las porfirinas y metaloporfirinas (arriba) y de las clorinas y metalochlorinas (abajo) en DMSO a 1×10^{-5} M.

Normalmente, realizar modificaciones de los sustituyentes en las periferias de la porfina no provoca cambios significativos en el espectro de absorción, mientras que, la desprotonación de dos de los átomos de nitrógeno (NH) interiores o la inserción de átomos metálicos en el macrociclo sí suelen modificar fuertemente el espectro de absorción. Por esta razón, al poner rutenio en la cavidad central de la porfina o clorina ya no se observaron las 4 bandas Q, sino, solo 2 bandas Q, Q_α y Q_β , observadas entre 500 y 600 nm. Se asignan a transiciones de transferencia de carga, π - $d\pi$ entre el anillo de tetrapirrol y el metal.^{122,126} La disminución del número de bandas Q es típico en metaloporfirinas y metalochlorinas ya que, cuando el ion metálico se coordina con los átomos N del macrociclo, la simetría de la molécula aumenta ($D_{2h} \rightarrow D_{4h}$) y, por lo tanto, el número de bandas Q disminuye.^{122,127}

5.3 Pruebas de estabilidad

Con el fin de evaluar el comportamiento de los compuestos en condiciones similares a las usadas en los ensayos biológicos, se evaluó la estabilidad de los compuestos mediante espectrofotometría UV-Vis. A continuación, se muestran los espectros de absorción de cada compuesto en DMSO puro y en el medio biológico PBS, el cual contenía 0.1% de DMSO. Para conocer la estabilidad de cada compuesto fue necesario monitorear las muestras durante 24 h cuando se usó DMSO puro y 8 horas (ya que es el tiempo que dura el tratamiento de cada compuesto en el cultivo celular) cuando se usó el medio biológico PBS. En ambos medios, todos los espectros se midieron a 37 °C y a una concentración de 1×10^{-5} M.

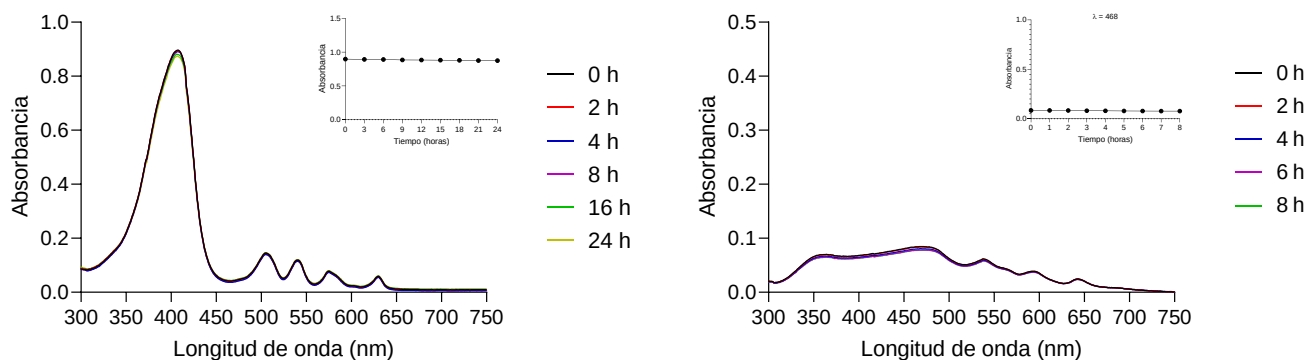


Figura 43. Espectros UV-Vis para **dMePpIX** en DMSO (izquierda) y PBS/DMSO 0.1% (derecha). La inserción representa el cambio del espectro a través del tiempo.

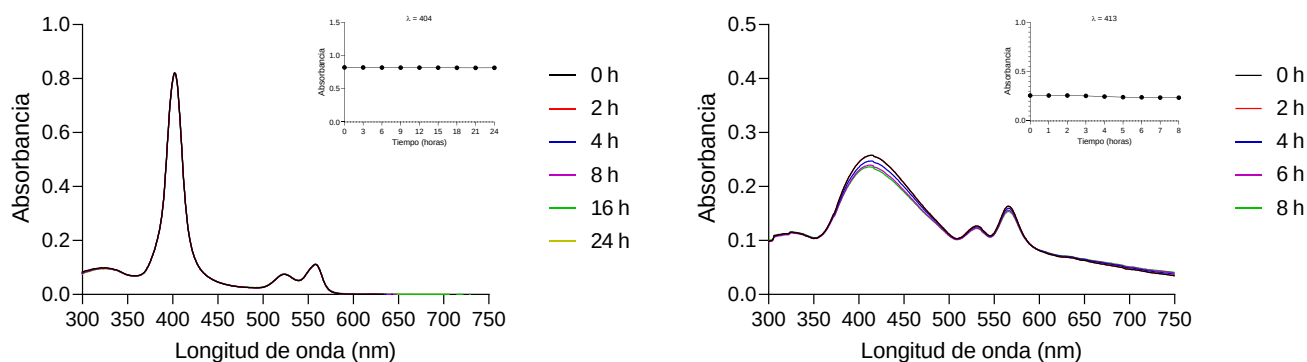


Figura 44. Espectros UV-Vis para **[Ru(dMePpIX)CO]** en DMSO (izquierda) y PBS/DMSO 0.1% (derecha). La inserción representa el cambio del espectro a través del tiempo.

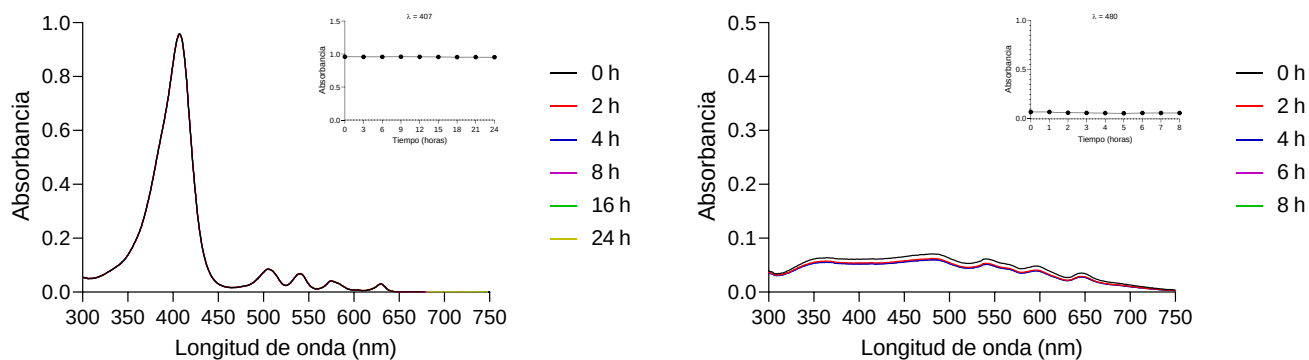


Figura 45. Espectros UV-Vis para **dBNPpIX** en DMSO (izquierda) y PBS/DMSO 0.1% (derecha). La inserción representa el cambio del espectro a través del tiempo.

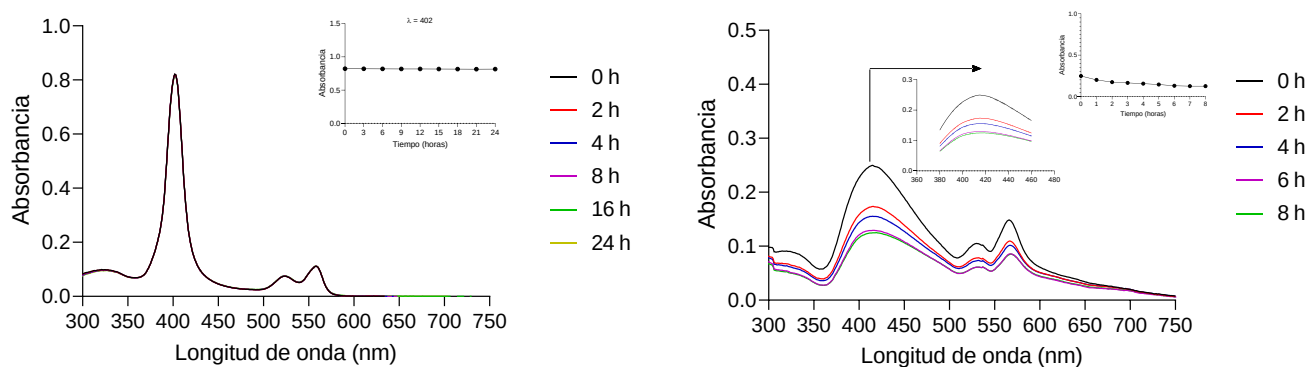


Figura 46. Espectros UV-Vis para **[Ru(dBNPpIX)CO]** en DMSO (izquierda) y PBS/DMSO 0.1% (derecha). La inserción representa el cambio del espectro a través del tiempo y el cambio de la absorbancia de la banda Q a través del tiempo.

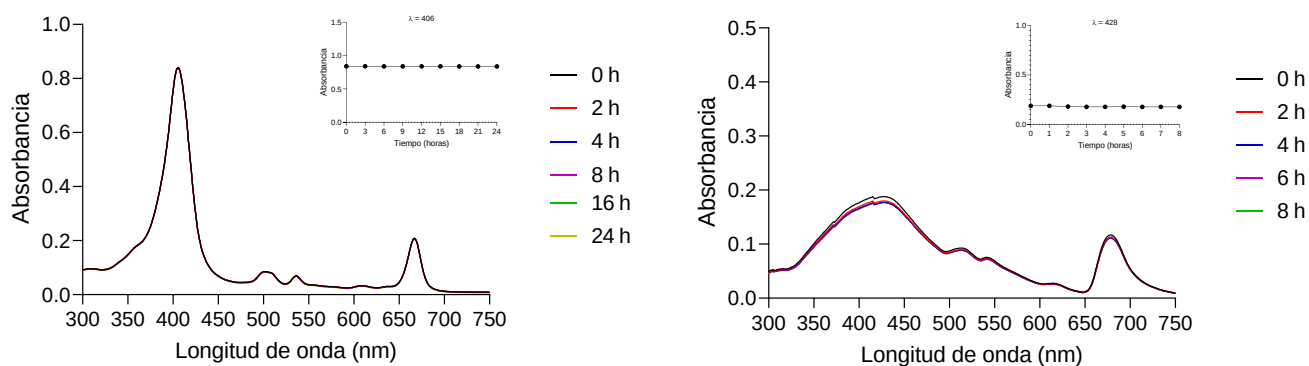


Figura 47. Espectros UV-Vis para **dMeCloA** en DMSO (izquierda) y PBS/DMSO 0.1% (derecha). La inserción representa el cambio del espectro a través del tiempo y el cambio de la absorbancia de la banda Q a través del tiempo.

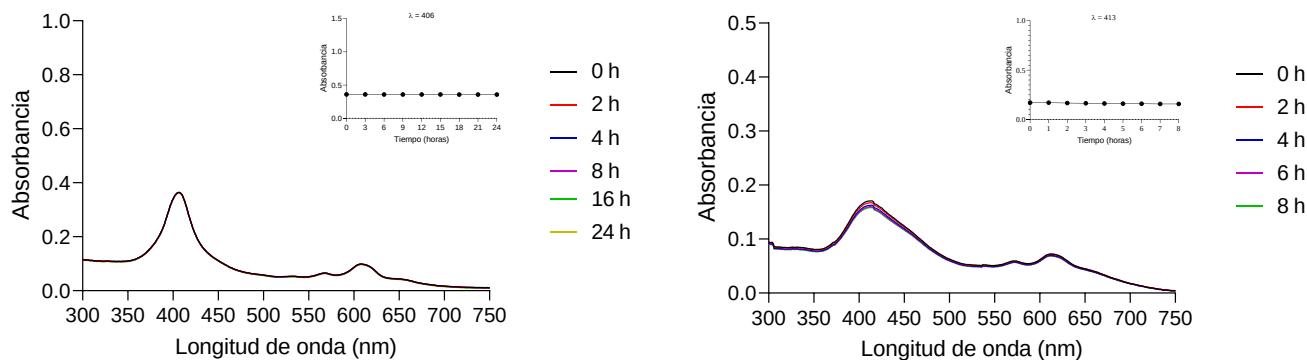


Figura 48. Espectros UV-Vis para $[Ru(dMeCloA)CO]$ en DMSO (izquierda) y PBS/DMSO 0.1% (derecha). La inserción representa el cambio del espectro a través del tiempo.

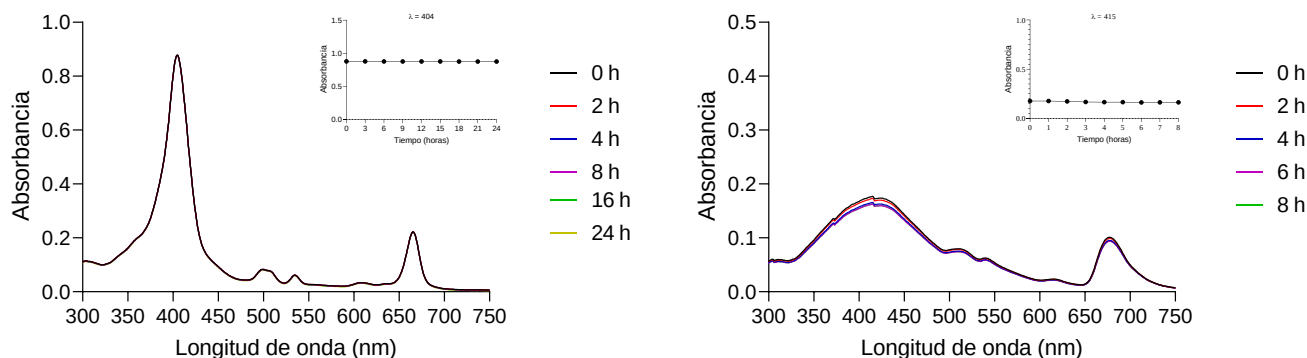


Figura 49. Espectros UV-Vis para $dMeCloB$ en DMSO (izquierda) y PBS/DMSO 0.1% (derecha). La inserción representa el cambio del espectro a través del tiempo.

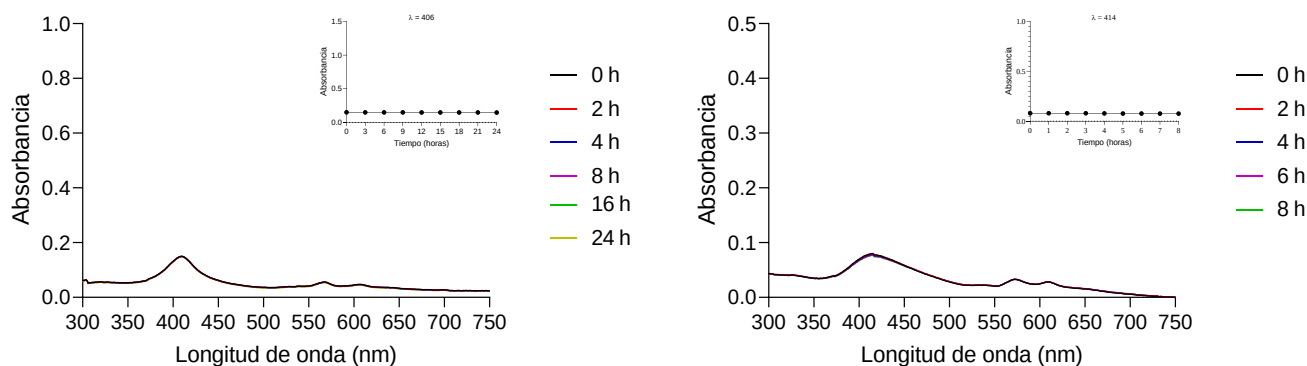


Figura 50. Espectros UV-Vis para $[Ru(dMeCloB)CO]$ en DMSO (izquierda) y PBS/DMSO 0.1% (derecha). La inserción representa el cambio del espectro a través del tiempo.

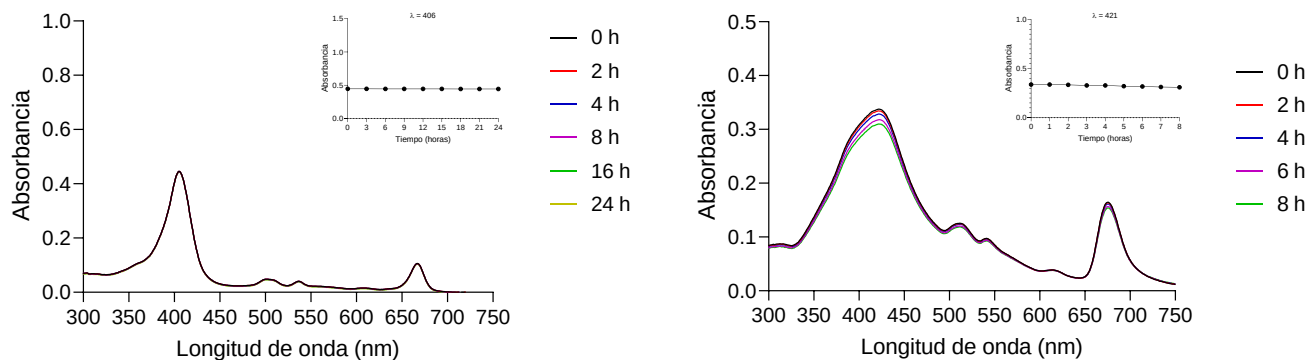


Figura 51. Espectros UV-Vis para **dBnCloA** en DMSO (izquierda) y PBS/DMSO 0.1% (derecha). La inserción representa el cambio del espectro a través del tiempo.

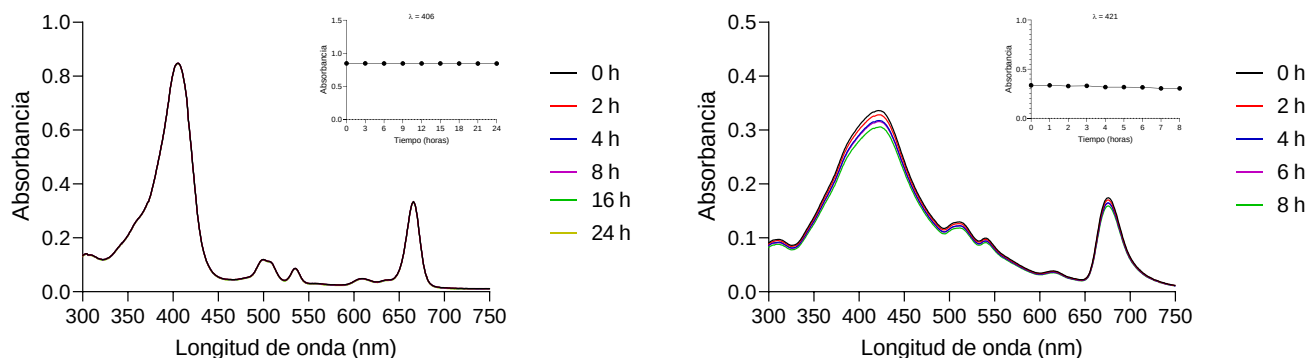


Figura 52. Espectros UV-Vis para **dBnCloB** en DMSO (izquierda) y PBS/DMSO 0.1% (derecha). La inserción representa el cambio del espectro a través del tiempo.

En DMSO, al igual que en PBS/DMSO 0.1%, no se observó descomposición de los compuestos. Esto significa que los compuestos son suficientemente estables para realizar los estudios biológicos. Sin embargo, el compuesto **[Ru(dBnPpIX)CO]** presentó un 48% de descomposición en PBS/DMSO 0.1% como podemos ver en la **Figura 46** (derecha).

5.4 Pruebas de fotoestabilidad

Como se mencionó anteriormente, se desea usar los compuestos sintetizados como fotosensibilizadores en la terapia fotodinámica. Una de las principales características que tiene que presentar un PS es que sea fotoactivable y fotoestable. Por lo tanto, analizar el efecto de la luz sobre los compuestos es importante. La medición a la tolerancia y estabilidad lumínica de cada compuesto se estudió mediante espectrofotometría UV-Vis a 37 °C y a una concentración de 1×10^{-5} M, cada 3 minutos después de irradiar la celda con luz blanca. Se realizó una medición hasta completar 6 mediciones para un total de 15 minutos de irradiación.

En DMSO puro (**Figura 53–57**) se puede observar que todos los compuestos son suficientemente estables bajo irradiación con luz blanca por 15 minutos.

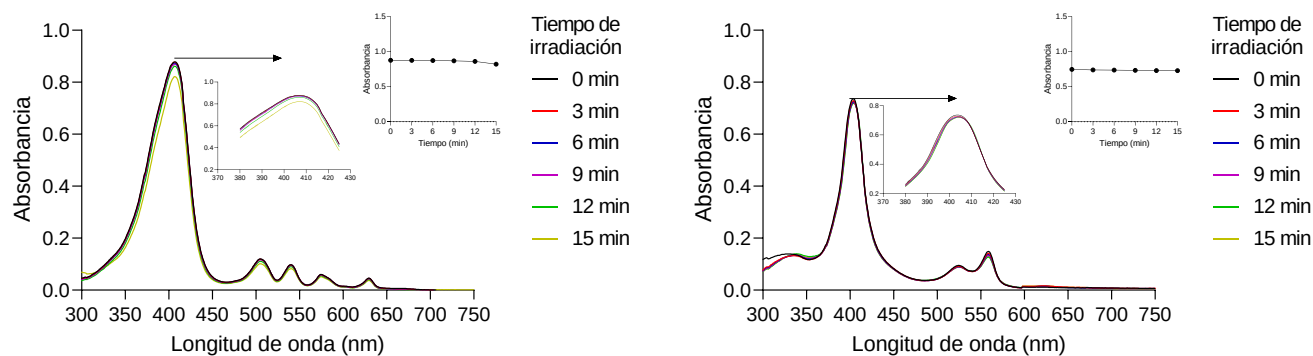


Figura 53. Espectros UV-Vis para **dMePpIX** (izquierda) y **[Ru(dMePpIX)CO]** (derecha) en DMSO. La inserción representa el cambio de la absorbancia de la banda Soret a través del tiempo de irradiación.

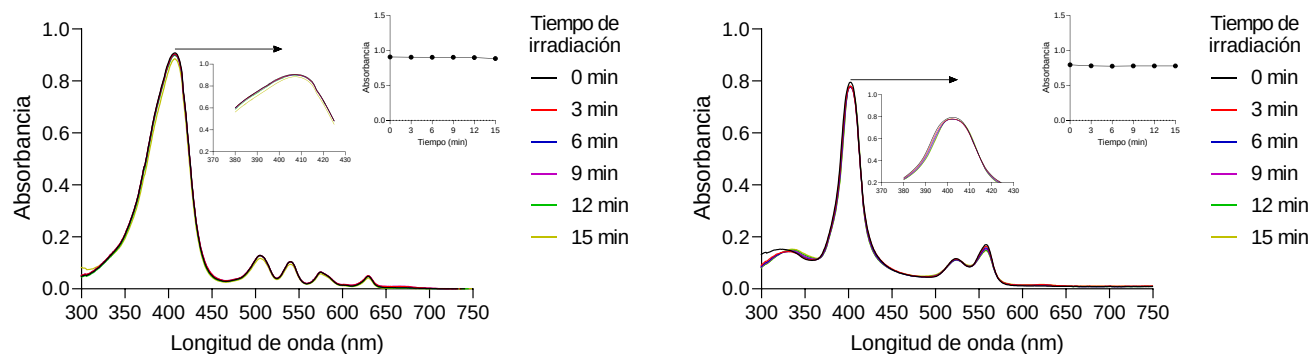


Figura 54. Espectros UV-Vis para **dBnPpIX** (izquierda) y **[Ru(dBnPpIX)CO]** (derecha) en DMSO. La inserción representa el cambio de la absorbancia de la banda Soret a través del tiempo de irradiación.

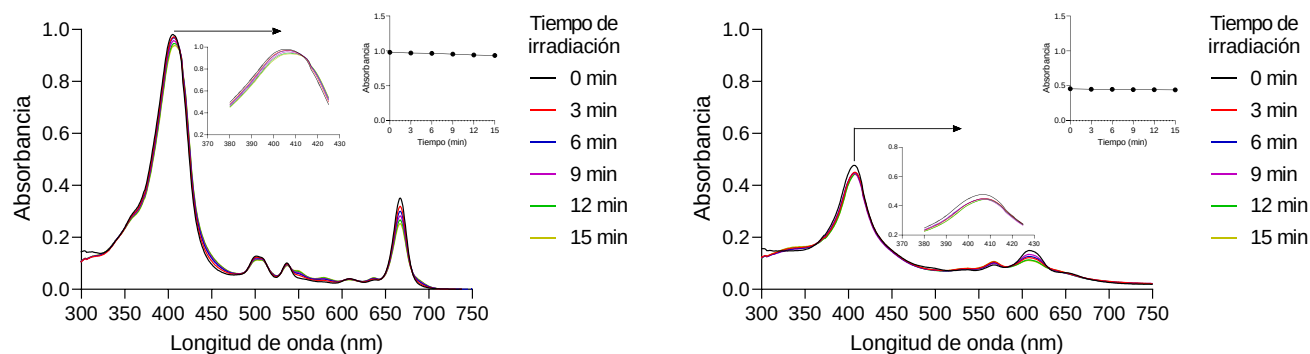


Figura 55. Espectros UV-Vis para **dMeCloA** (izquierda) y **[Ru(dMeCloA)CO]** (derecha) en DMSO. La inserción representa el cambio de la absorbancia de la banda Soret a través del tiempo de irradiación.

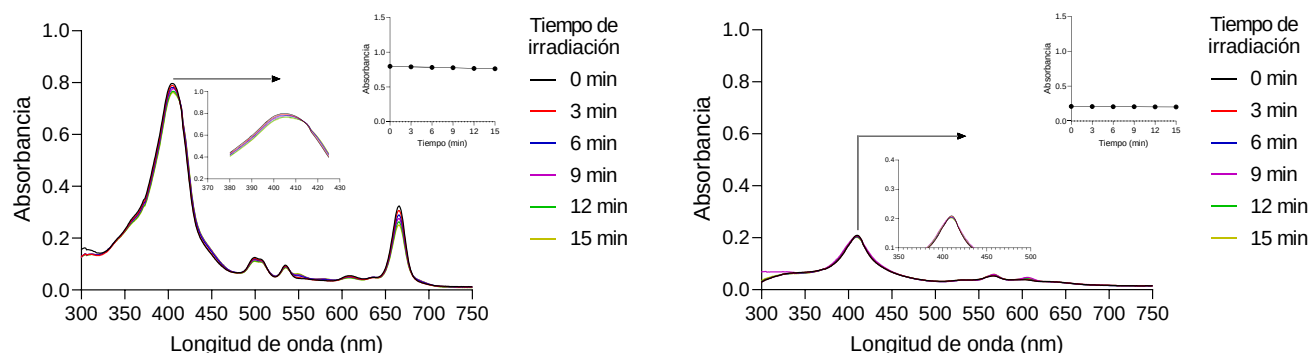


Figura 56. Espectros UV-Vis para **dMeCloB** (izquierda) y **[Ru(dMeCloB)CO]** (derecha) en DMSO. La inserción representa el cambio de la absorbancia de la banda Soret a través del tiempo de irradiación.

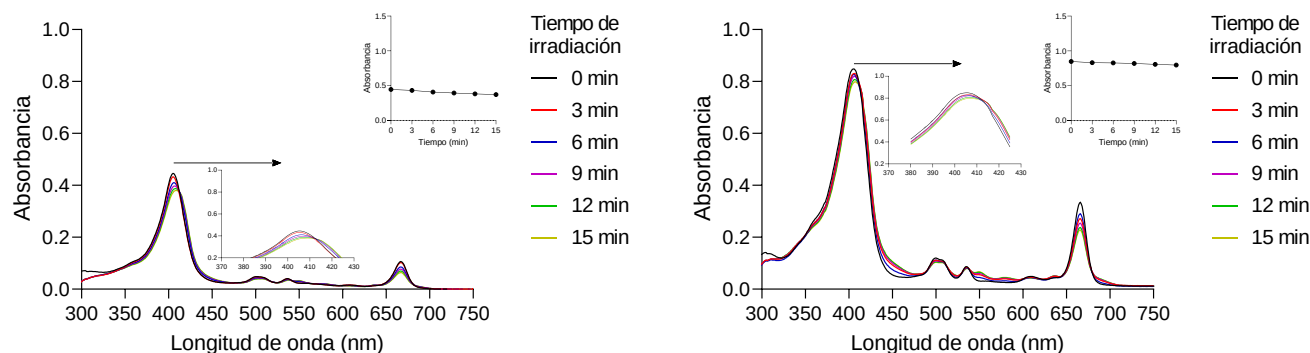


Figura 57. Espectros UV-Vis para **dBnCloA** (izquierda) y **dBnCloB** (derecha) en DMSO. La inserción representa el cambio de la absorbancia de la banda Soret a través del tiempo de irradiación.

Además, se seleccionaron 4 compuestos para estudiar su fotoestabilidad en el medio biológico PBS el cual contenía 0.1% de DMSO como se observa en las figuras 58 y 59.

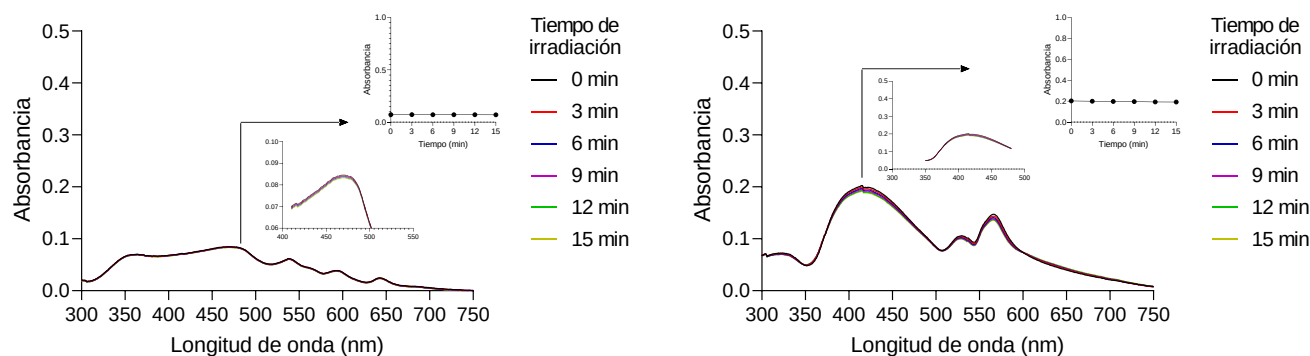


Figura 58. Espectros UV-Vis para **dMePpIX** (izquierda) y **[Ru(dMePpIX)CO]** (derecha) en PBS/DMSO 0.1 %. La inserción representa el cambio de la absorbancia de la banda Soret a través del tiempo de irradiación.

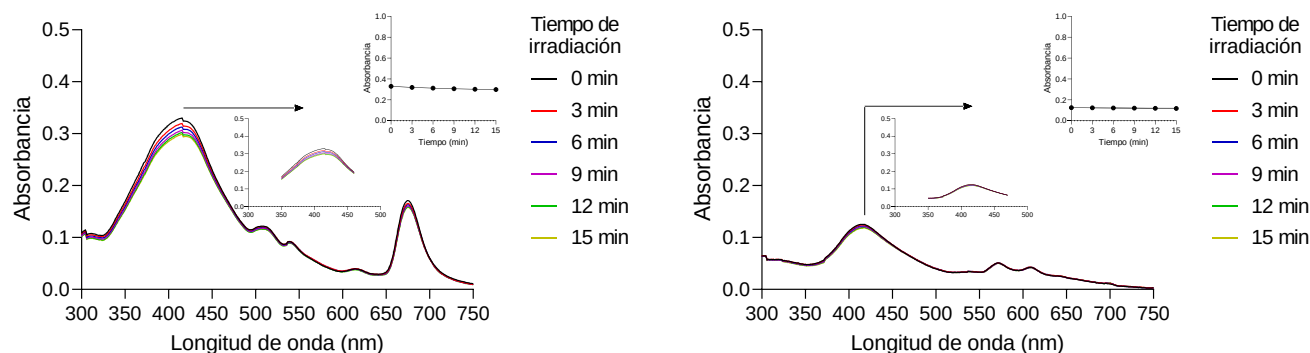


Figura 59. Espectros UV-Vis para **dMeCloB** (izquierda) y **[Ru(dMeCloB)CO]** (derecha) en PBS/DMSO 0.1 %. La inserción representa el cambio de la absorbancia de la banda Soret a través del tiempo de irradiación.

En todos los casos los compuestos mostraron un ligero efecto de fotoblanqueo ya que se observó una disminución de aproximadamente entre el 1 - 3% en la absorción de la banda de Soret (404-410 nm). Sin embargo, se considera que nuestros compuestos son lo suficientemente fotoestables bajo irradiación con luz blanca para su posterior evaluación biológica ya que, para estos estudios se irradiarán las células por un periodo de 15 minutos en presencia del PS .

5.5 Lipofilicidad

Cuando se sintetizan nuevas moléculas con objetivos bioquímicos, como lo es en este estudio, una característica principal es determinar si los compuestos pueden ser absorbidos y distribuidos en el cuerpo humano. El transporte por difusión pasiva es el más común. Para ser absorbidos por esta vía, los fármacos deben ser lo suficientemente lipofílicos como para penetrar la barrera lipídica de las membranas.¹²⁸ En este contexto, el coeficiente de partición *n*-octanol/agua ($\log P$) es un parámetro bien establecido que nos ayuda a predecir la lipofilicidad de fármacos y compuestos biológicamente activos. Para determinar el $\log P$ de los compuestos sintetizados en este trabajo utilizamos 1-octanol/PBS mediante el método “shake flask”.¹²⁹

Por lo tanto, un valor de $\log P$ mayor que 1 indica que el compuesto presenta mayor afinidad por la fase orgánica, es decir, presenta mayor carácter lipofílico. Mientras que, si $\log P$ es menor que 1, el compuesto presenta una mayor afinidad por la fase acuosa.¹³⁰ Además, las propiedades lipofílicas e hidrofílicas afectan tanto a la distribución como a la captación de un PS. Los fotosensibilizadores hidrofílicos se unen predominantemente a la albúmina, mientras que los PS lipofílicos se distribuyen principalmente entre el retículo endoplásmico y la mitocondria, y donde ejercen su actividad citotóxica.¹³¹

En los resultados mostrados en la **Tabla 6** se observa que todos los compuestos presentaron valores de $\log P_{O/PBS}$ mayor a 1. Por lo tanto, se espera que los compuestos puedan ser fácilmente absorbidos por la célula.

Tabla 6. Coeficiente de partición ($\log P_{O/PBS}$) de los compuestos a 25°C.

Compuesto	$\log P_{O/PBS}$
dMePpIX	0.957 ± 0.056
[Ru(dMePpIX)CO]	1.014 ± 0.058
dBnPpIX	1.063 ± 0.142
[Ru(dBnPpIX)CO]	1.032 ± 0.108
dMeCloA	1.478 ± 0.083
[Ru(dMeCloA)CO]	1.396 ± 0.051
dMeCloB	1.661 ± 0.088
[Ru(dMeCloB)CO]	1.510 ± 0.177
dBnCloAB	1.569 ± 0.048
dBnCloA	1.368 ± 0.042
dBnCloB	1.682 ± 0.176

Los experimentos se realizaron por triplicado

5.6 Rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_f)

Los espectros de emisión fueron medidos en DMSO y los rendimientos cuánticos de fluorescencia se determinaron utilizando verteporfina (VP) como referencia ($\Phi_f = 0.0085$). Los ligantes libres se excitaron a 503 nm, mientras que los complejos de Ru(II) se excitaron a 573 nm. En ambas longitudes de onda de excitación seleccionadas se buscó que la absorbancia fuera inferior a 0.05. Los espectros de emisión obtenidos se muestran en la **Figura 60-62**.

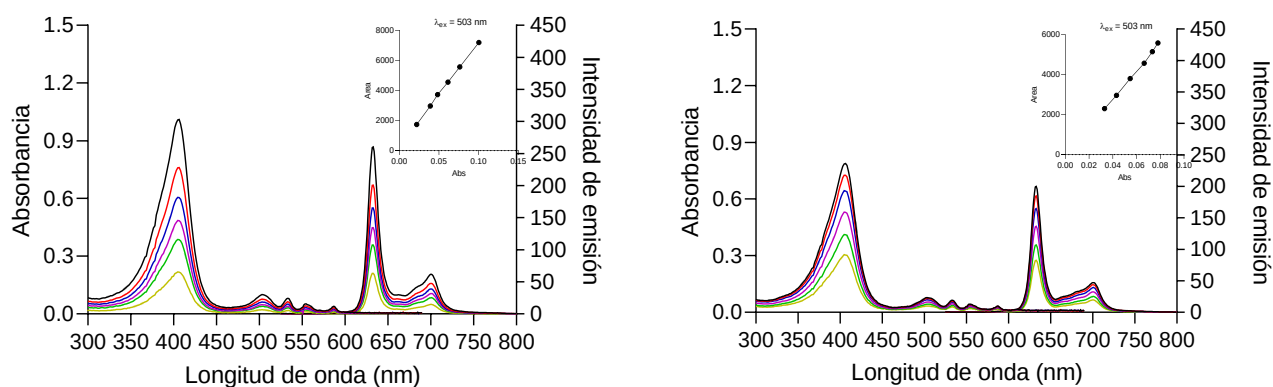


Figura 60. Espectros de absorción y emisión para **dMePpIX** (izquierda) y **dBnPpIX** (derecha) en DMSO a 1×10^{-6} M. La inserción representa la curva construida trazando el área bajo la curva del espectro de emisión en función de la absorbancia en la longitud de onda de excitación.

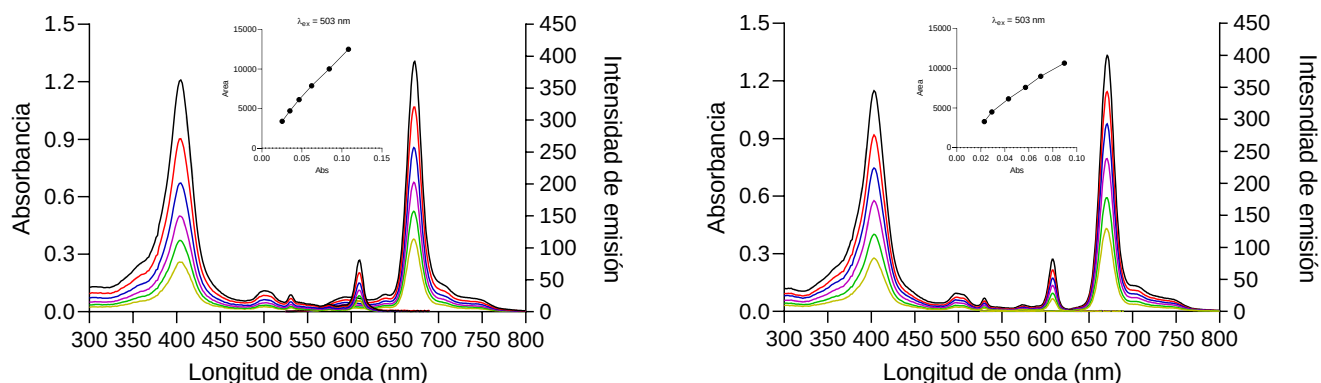


Figura 61. Espectros de absorción y emisión para **dMeCloA** (izquierda) y **dMeCloB** (derecha) en DMSO a 1×10^{-6} M. La inserción representa la curva construida trazando el área bajo la curva del espectro de emisión en función de la absorbancia en la longitud de onda de excitación.

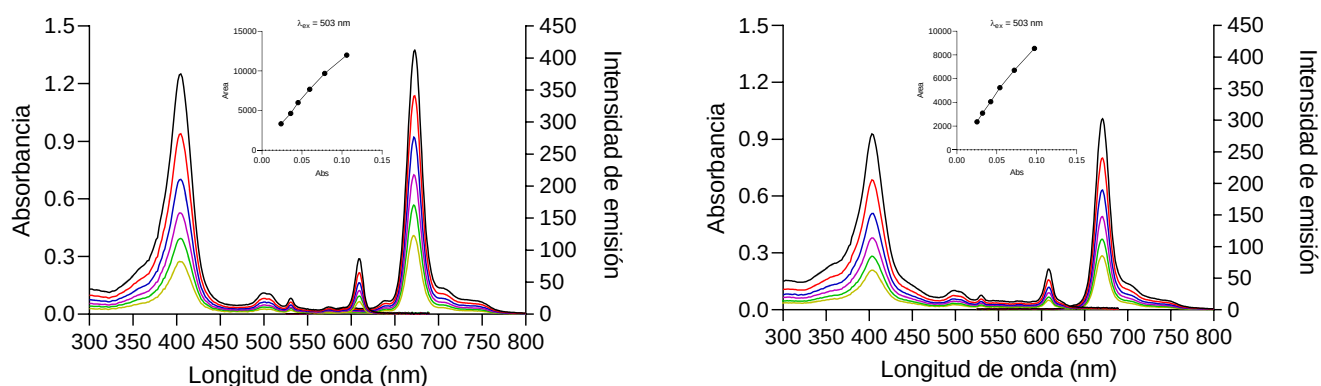


Figura 62. Espectros de absorción y emisión para **dBnCloA** (izquierda) y **dBnCloB** (derecha) en DMSO a 1×10^{-6} M. La inserción representa la curva construida trazando el área bajo la curva del espectro de emisión en función de la absorbancia en la longitud de onda de excitación.

Para las metaloporfirinas y metaloclorinas no se observaron señales de fluorescencia. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia de los compuestos se muestran en la **Tabla 7** y se determinaron utilizando el método del gradiente mediante la siguiente ecuación.¹³²

$$\Phi_f = \Phi_{ST} \left(\frac{Grad_x}{Grad_{ST}} \right) \left(\frac{\eta_X^2}{\eta_{ST}^2} \right)$$

Donde ST y X corresponden al estándar y al analito respectivamente, Φ_f es el rendimiento cuántico de fluorescencia, Grad es el gradiente del área de integración de la intensidad de fluorescencia de la referencia vs el área de integración de la absorbancia del analito y η es el índice de refracción del disolvente utilizado.

Tabla 7. Valores obtenidos del cálculo del rendimiento cuántico de fluorescencia.

Compuesto	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Φ_f (%)
VP	503	693	0.85
dMePpIX	503	633	0.80
[Ru(dMePpIX)CO]	573	n.d	0
dBnPpIX	503	633	0.80
[Ru(dBnPpIX)CO]	573	n.d	0
dMeCloA	503	673	1.2
[Ru(dMeCloA)CO]	573	n.d	0
dMeCloB	503	670	1.2
[Ru(dMeCloB)CO]	573	n.d	0
dBnCloA	503	674	1.0
dBnCloB	503	770	1.0

λ_{abs} : máximo de absorción, λ_{em} : máximo de emisión, Φ_f : rendimiento cuántico de fluorescencia, n.d.: no detectado.

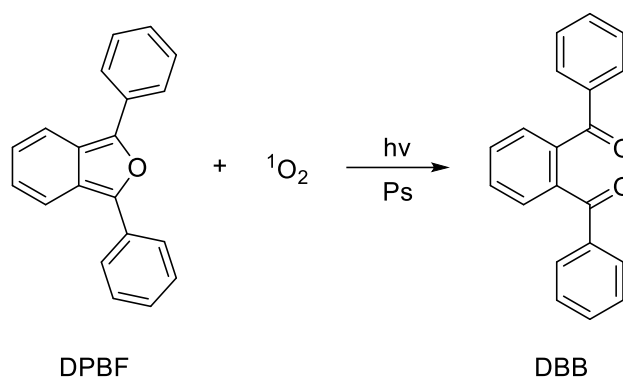
Las porfirinas y clorinas libres de metal se caracterizan por presentar dos bandas de emisión, la primer banda de emisión centrada entre 600 y 670 nm correspondiente a transiciones $S_2 \rightarrow S_0$, y la segunda, entre 700 y 750 nm, asignada a las transiciones $S_1 \rightarrow S_0$ de menor energía,^{133,134} como se observó en las **Figuras 60-62**.

Cuando se favorece el cruce entre sistemas (ISC), es decir la transición de $S_1 \rightarrow T_1$, ese observa un debilitamiento en la intensidad de la fluorescencia.^{135,136} En los complejos de Ru(II) no se observaron bandas de emisión, lo cual podría indicar que, al incorporar un átomo pesado, en este caso el Ru en la cavidad central de los tetrapirroles se favorece el ISC, posiblemente mediante el acoplamiento espín-órbita (SOC) o mediante procesos de agregación.¹³⁷ Por lo tanto, esto podría conducir a una mayor producción de especies tripletes excitadas,^{136,138} ya que, según la literatura, mejorar la eficiencia del ISC en los PS podría mejorar la producción de $^1\text{O}_2$.^{139,140}

5.7 Rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete (Φ_Δ)

Se utilizó un método indirecto para calcular el rendimiento cuántico de oxígeno singlete de los compuestos, utilizando 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) que en presencia de $^1\text{O}_2$, un PS y una fuente de luz se oxida a 1,2-dibenzoilbenceno (DBB) **Ecuación 1**. El complejo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3](\text{PF}_6)_2$ ($\Phi_\Delta = 0.66$)¹⁴¹ y la verteporfina ($\Phi_\Delta = 0.77$)¹⁴² fueron usados como referencia en DMSO.

Cabe mencionar que la referencia $[\text{Ru}(\text{bpy})_3](\text{PF}_6)_2$ fue sintetizado en nuestro laboratorio siguiendo la metodología reportada en la literatura¹⁴³ y la selección de verteporfina como estándar fue por su alta capacidad para producir oxígeno singlete y por su gran similitud con los compuestos sintetizados en este estudio.



Ecuación 1. Fotooxidación de DPBF a DBB.

Todos los experimentos se realizaron a una concentración de 5×10^{-6} M para cada PS y 1×10^{-5} M para DPBF en DMSO. La fotodegradación de DPBF se siguió mediante espectrofotometría UV-Vis después de irradiar cada muestra con luz blanca por 6 segundos durante 11 veces consecutivas.

Primero, se estudió si el compuesto DPBF era lo suficiente estable bajo la fuente de luz seleccionada. Como se observa en la **Figura 63**, el compuesto DPBF no mostró señales de degradación bajo las condiciones seleccionadas.

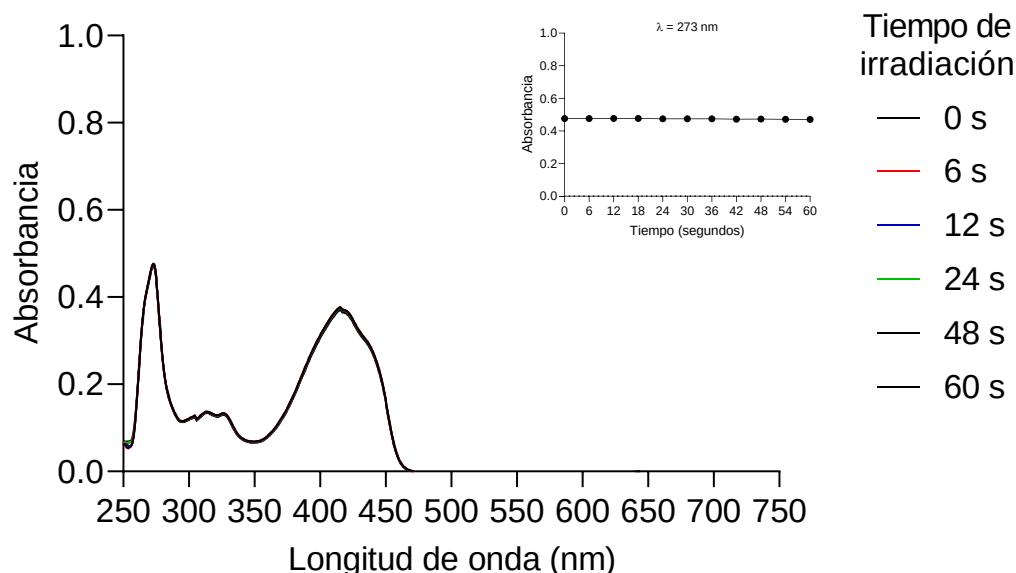


Figura 63. Espectro de absorción de DPBF tras la irradiación con luz blanca. La inserción representa el cambio de la absorbancia a 274 nm a través del tiempo de irradiación.

Una vez conocida la fotoestabilidad de DPBF, lo siguiente fue calcular la constante de descomposición (K_{ref}) de DPBF en presencia de nuestros estándares $[\text{Ru}(\text{bpy})_3](\text{PF}_6)_2$ y VP. Los espectros y las curvas lineales del estándar para determinar la K_{ref} se muestran en la **Figura 64**. La constante de descomposición hace referencia a la pendiente obtenida a la curva lineal (**Figura 64 b y d**) del

cambio de la absorbancia de DPBF en presencia del estándar o del PS a través del tiempo de irradiación

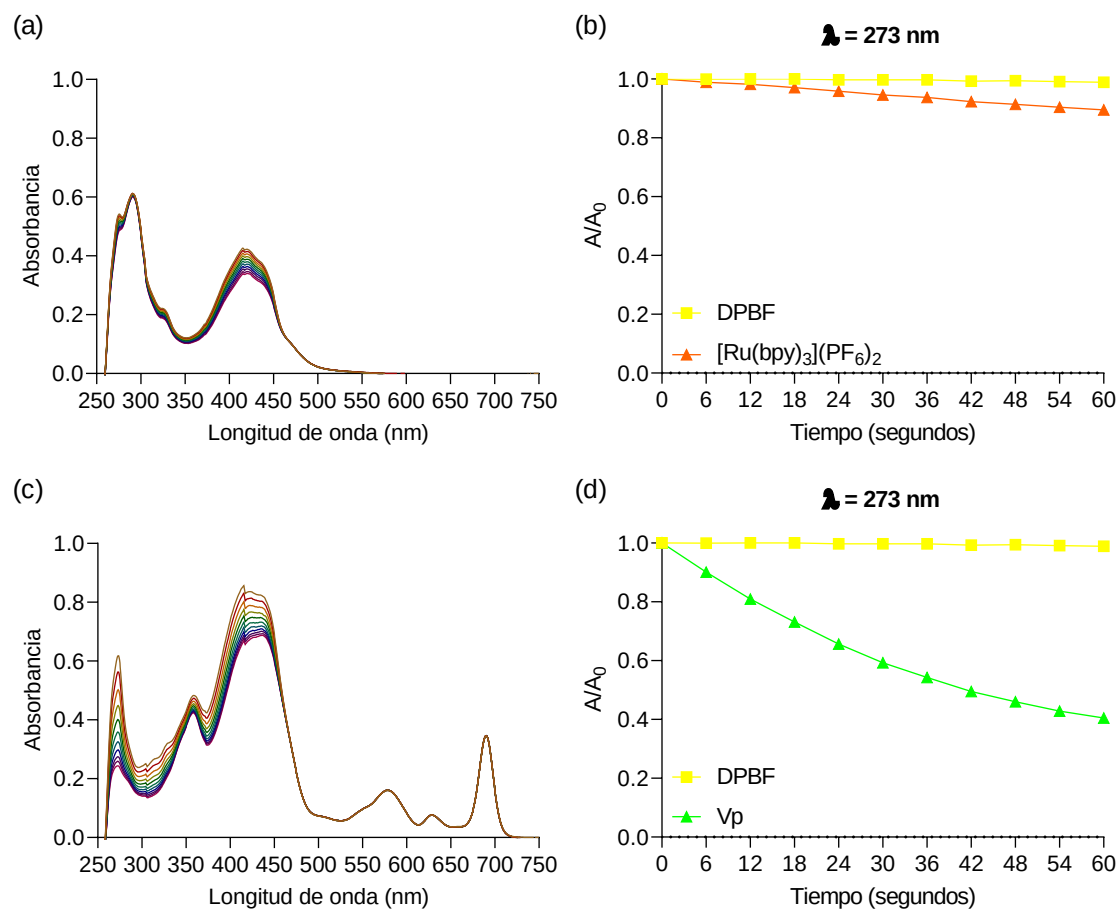


Figura 64. Espectros de absorción de DPBF y [Ru(bpy)₃](PF₆)₂ (a) y DPBF y VP (c) en DMSO tras la irradiación con luz blanca y curvas de fotodegradación de DPBF en presencia de [Ru(bpy)₃](PF₆)₂ (b) y VP (d) a 273 nm.

Luego, se procedió a calcular la constante de descomposición de DPBF (K_{PS}) en presencia de cada PS como se muestran en la **Figura 65-67**.

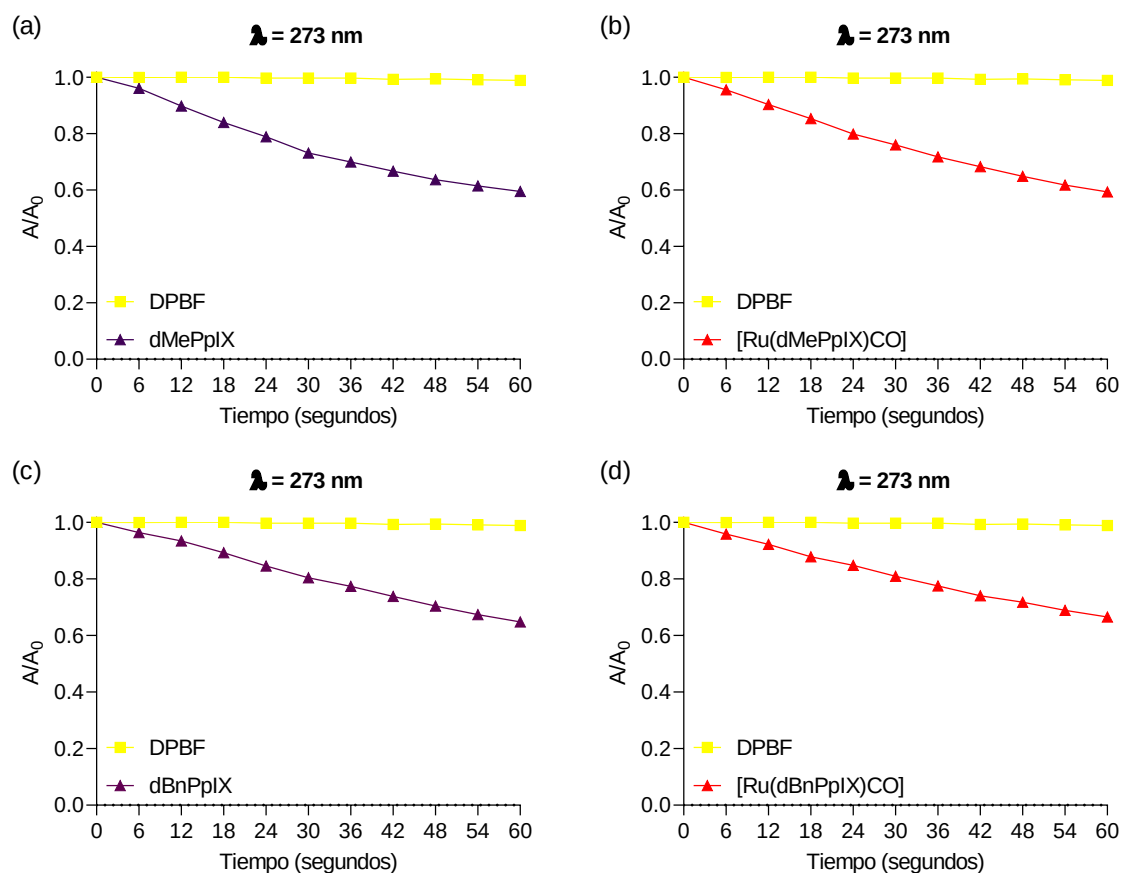


Figura 65. Curvas de fotodegradación de DPBF en la presencia de **dMePpIX** (a), **[Ru(dMePpIX)CO]** (b), **dBnPpIX** (c) y **[Ru(dBnPpIX)CO]** (d) a 273 nm.

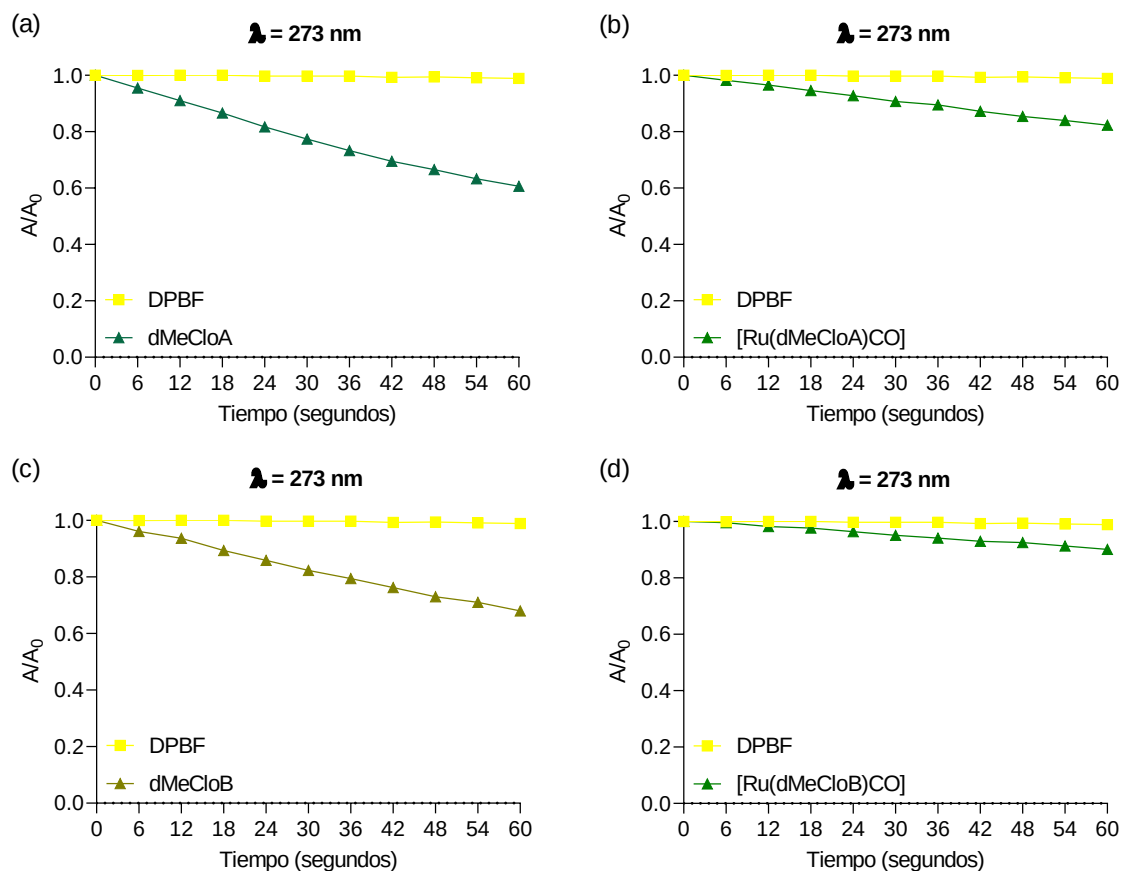


Figura 66. Curvas de fotodegradación de DPBF en la presencia de **dMeCloA** (a), **[Ru(dMeCloA)CO]** (b), **dMeCloB** (c), **[Ru(dMeCloB)CO]** (d) a 273 nm.

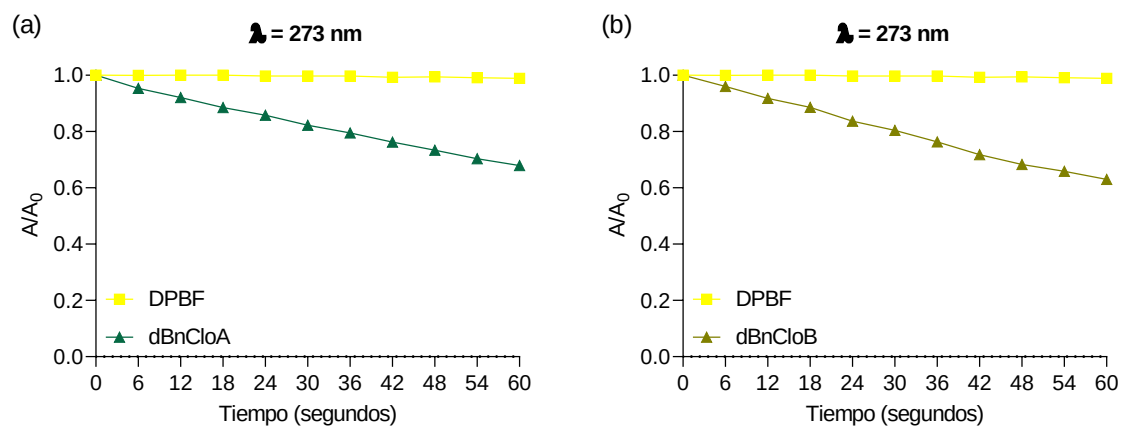


Figura 67. Curvas de fotodegradación de DPBF en la presencia de **dBnCloA** (a), **dBnCloB** (b) a 273 nm.

Una vez conocidas la constante de descomposición del DPBF en presencia de la referencia (K_{ref}) y la K_{PS} procedimos a calcular el rendimiento cuántico de oxígeno singulete de cada compuesto usando la siguiente ecuación.¹⁴⁴

$$\Phi_{\Delta PS} = \Phi_{\Delta ref} \frac{k_{PS}}{k_{ref}}$$

Donde PS son los PS estudiados en este trabajo, $\Phi_{\Delta ref}$ es el rendimiento cuántico de oxígeno singulete de la referencia en DMSO, k representa la pendiente de las muestras y la referencia calculada mediante el cambio de absorbancia del DPBF en los máximos de absorbancia con respecto al tiempo de irradiación.

Tabla 8. Rendimientos cuánticos de formación de oxígeno singulete.

Compuesto	Φ_{Δ} (%) ^a	Φ_{Δ} (%) ^b
VP	66	77
dMePpIX	> 100	34 ± 0.764
[Ru(dMePpIX)CO]	> 100	28 ± 1.000
dBnPpIX	> 100	34 ± 1.528
[Ru(dBnPpIX)CO]	> 100	30 ± 1.756
dMeCloA	> 100	46 ± 2.082
[Ru(dMeCloA)CO]	70	16 ± 1.500
dMeCloB	> 100	43 ± 2.500
[Ru(dMeCloB)CO]	57	11 ± 2.021
dBnCloA	> 100	34 ± 1.041
dBnCloB	> 100	33 ± 2.517

Los resultados mostrados en Φ_{Δ} (%)^b son la combinación de tres experimentos

^aRepresenta los resultados obtenidos usando como referencia [Ru(bpy)₃](PF₆)₂

^bRepresenta los resultados obtenidos usando como referencia verteporfina

Como se observa en la **Tabla 8**, comprobamos que en todos los casos la absorbancia del DPBF a 273 nm disminuye en presencia de cada compuesto, lo que confirma la generación de oxígeno singulete. Sin embargo, los compuestos mostraron rendimientos cuánticos de oxígeno singulete superiores al de la referencia [Ru(bpy)₃](PF₆)₂, Por esta razón se obtuvieron valores mayores a 100%.

Usando la VP como estándar, también se logro observar que todos los compuestos presentan altos valores de rendimiento cuántico en la producción de oxígeno singulete ya que, el porcentaje de rendimiento cuántico de oxígeno singulete estaba entre el 30 y 50%. Curiosamente, para [Ru(dMeCloA)CO] y [Ru(dMeCloB)CO] se encontró que el rendimiento cuántico de oxígeno singulete fue solo del 15% y 11%, respectivamente, muy inferior al del resto de los compuestos, inclusive, y muy inferior al de sus ligante libres (dMeCloA y dMeCloB).

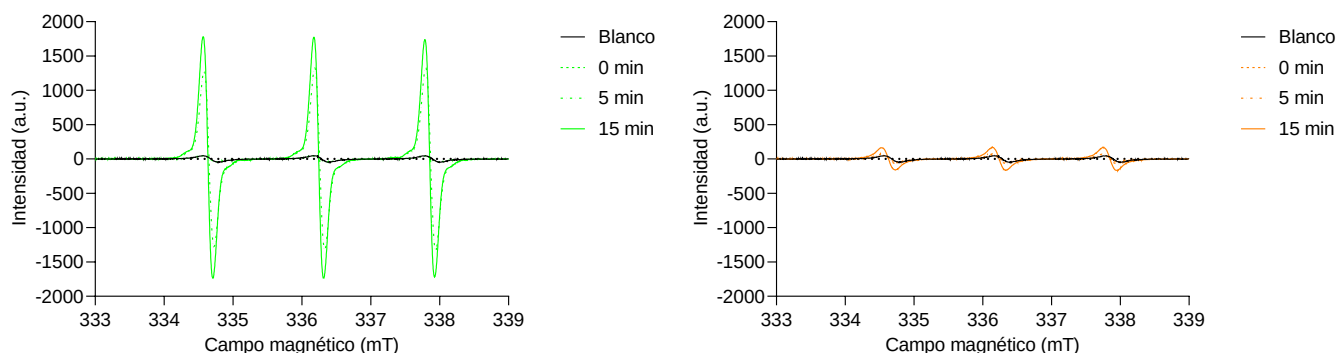
La eficacia que presentaron estos compuestos para generar oxígeno singulete se puede correlacionar con que podrían inhibir eficazmente el crecimiento de células cancerosas al ser usados como PS mediante la PDT, ya que, se ha demostrado que el oxígeno singulete es la principal especie reactiva de oxígeno generada por la excitación de agentes fotodinámicos en la PDT *in vitro*.^{145,146}

5.8 Determinación de especies reactivas de oxígeno por EPR

Dado que el oxígeno singulete tiene una vida media muy baja y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la **Sección 5.7**, se utilizó la Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) y trampas de espín (ST) como método indirecto para observar la

$$\text{TEMP} + \text{O}_2 \xrightarrow[\text{Ps}]{h\nu} \text{TEMPO} + \text{H}_2\text{O}$$

La detección de $^1\text{O}_2$ se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente procedimiento. Se preparó una disolución de cada compuesto a una concentración de 1×10^{-3} M junto con TEMP a 0.06 M en una disolución de etanol/DMSO (1%) equilibrada con aire a temperatura ambiente. Posteriormente, se irradió la muestra con luz blanca en una celda plana durante un máximo de 15 min. Se conoce que la VP y el $[\text{Ru}(\text{bpy})_3](\text{PF}_6)_2$ son compuestos que producen $^1\text{O}_2$. Por esta razón se usaron como control positivo, aunque curiosamente bajo nuestras condiciones el $[\text{Ru}(\text{bpy})_3](\text{PF}_6)_2$ produce bajas cantidades de $^1\text{O}_2$. En la **Figura 68** se observan los espectros de EPR obtenidos.



En todas las mediciones realizadas, claramente se aprecia que los PS producen $^1\text{O}_2$ eficientemente como se observa en las **Figuras 69-73**. Además, la intensidad del triplete característico del TEMPO no es de igual intensidad en todos los casos. Es decir, cada muestra irradiada presenta una diferente capacidad para producir oxígeno singulete. Sumado a eso, realizamos mediciones a diferentes tiempos de irradiación, y se observa que a medida que pasa el tiempo de irradiación la intensidad de la señal del TEMPO formado se incrementó.

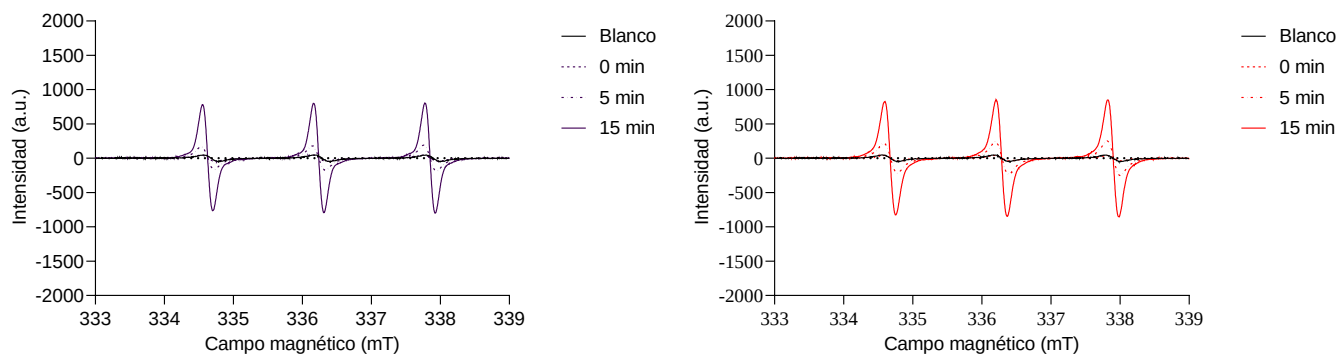


Figura 69. Espectros EPR obtenidos para **dMePpIX** (izquierda) y **[Ru(dMePpIX)CO]** (derecha) al usar TEMP como trampa de spin a diferentes tiempos de irradiación con luz blanca (0, 5 y 15 min) .

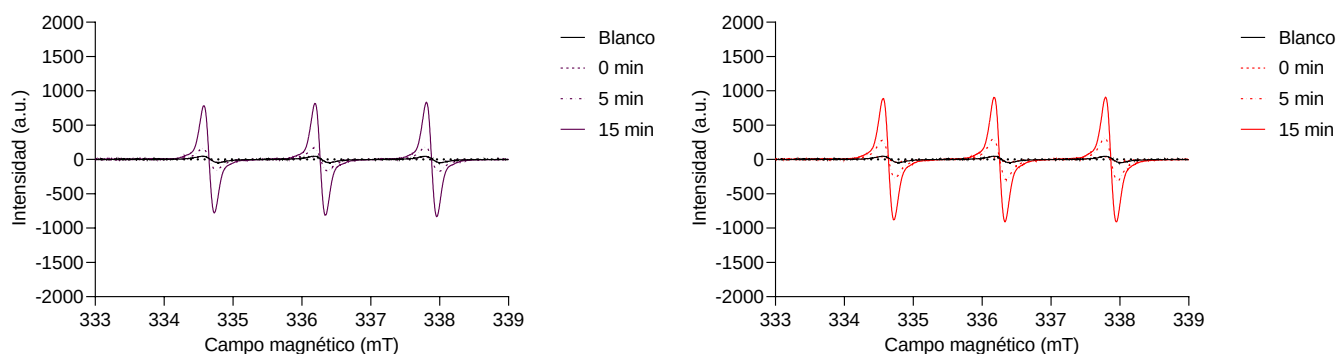


Figura 70. Espectros EPR obtenidos para **dBnPpIX** (izquierda) y **[Ru(dBnPpIX)CO]** (derecha) al usar TEMP como trampa de spin a diferentes tiempos de irradiación con luz blanca (0, 5 y 15 min) .

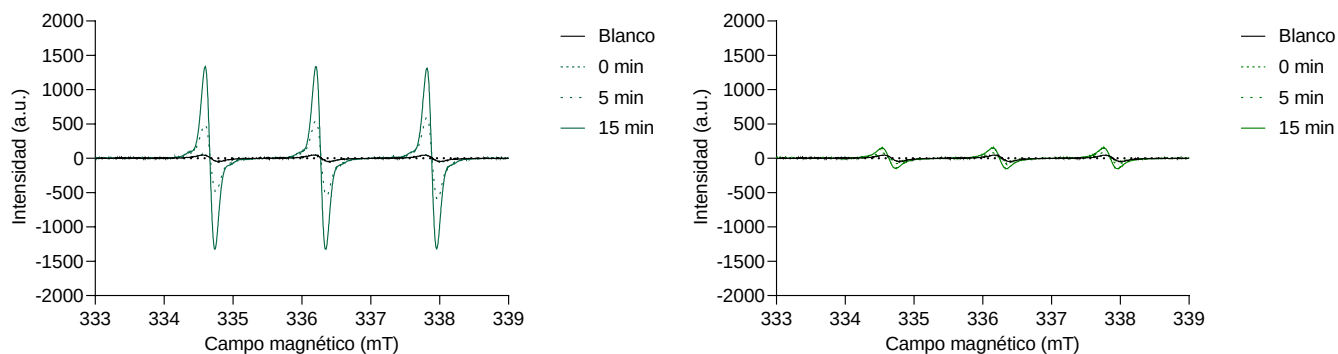


Figura 71. Espectros EPR obtenidos para **dMeCloA** (izquierda) y **[Ru(dMeCloA)CO]** (derecha) al usar TEMP como trampa de spin a diferentes tiempos de irradiación (0, 5 y 15 min) con luz blanca.

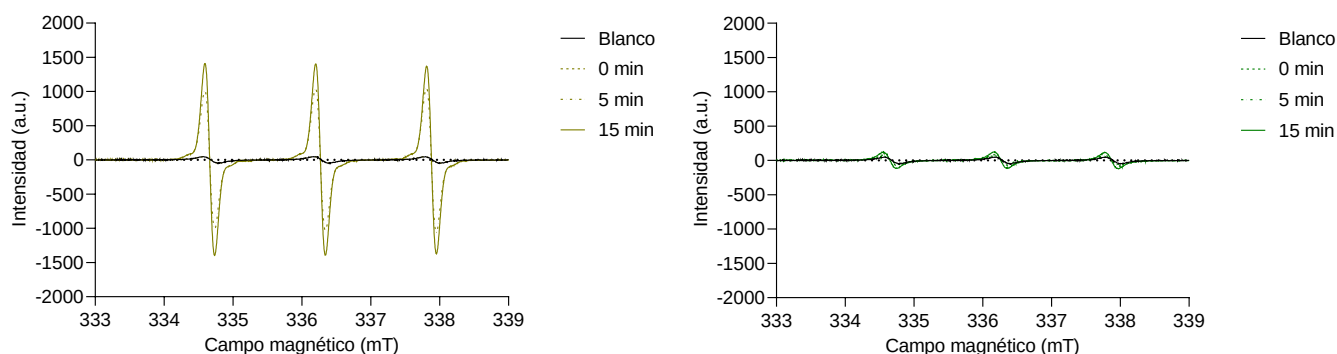


Figura 72. Espectros EPR obtenidos para **dMeCloB** (izquierda) y **[Ru(dMeCloB)CO]** (derecha) al usar TEMP como trampa de spin a diferentes tiempos de irradiación con luz blanca (0, 5 y 15 min) con luz blanca.

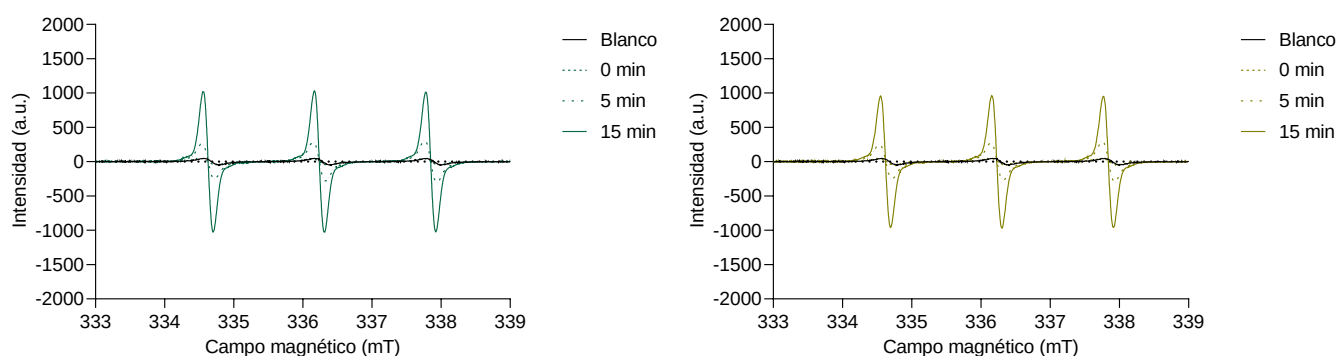


Figura 73. Espectros EPR obtenidos para **dBnCloA** (izquierda) y **dBnCloB** (derecha) al usar TEMP como trampa de spin a diferentes tiempos de irradiación con luz blanca (0, 5 y 15 min) con luz blanca.

En la **Figura 74** se puede observar la intensidad de la formación de TEMPO en presencia de cada PS estudiado, indicando que todos los compuestos podrían ser eficientes al usarse como PS en la PDT tipo II. Además, se observa que todos los compuestos pueden producir más TEMPO que la referencia $[\text{Ru}(\text{bpy})_3](\text{PF}_6)_2$. Sin embargo, de nuevo observamos que las metaloclorinas **[Ru(dMeCloA)CO]** y **[Ru(dMeCloB)CO]** produjeron $^1\text{O}_2$ en menor cantidad. Incluso, en menor cantidades que la de sus ligantes libres, pero, mejor que la referencia $[\text{Ru}(\text{bpy})_3](\text{PF}_6)_2$. Lo cual, también se observó en el rendimiento cuántico de oxígeno singlete, donde todos nuestros compuestos tuvieron un alto rendimiento cuántico de $^1\text{O}_2$ excepto las metaloclorinas mencionadas anteriormente.

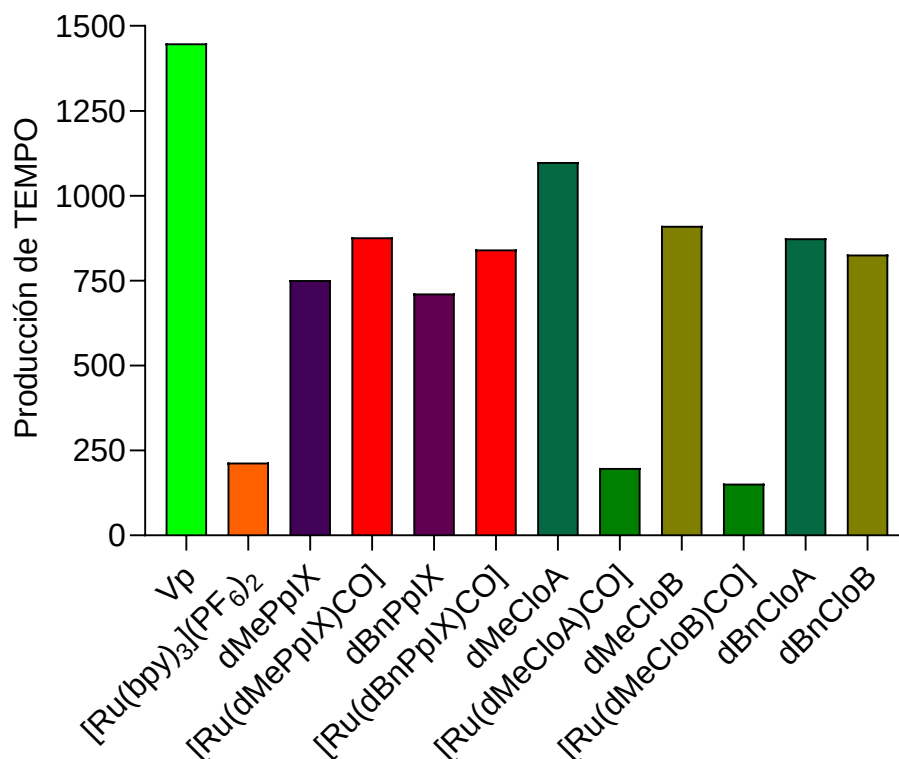


Figura 74. Intensidad de TEMPO obtenido por EPR producido después de 15 min de irradiación con luz blanca.

La producción de oxígeno singlete depende de la concentración de oxígeno triplete ($^3\text{O}_2$) presente en el medio.¹⁴⁷ Sin embargo, los tumores presentan bajos niveles de oxígeno,¹⁴⁸ por lo que, tener PS que puedan producir altos niveles de $^1\text{O}_2$ en hipoxia sería lo ideal. En este contexto seleccionamos los compuestos **dMePpIX**, **[Ru(dMePpIX)CO]**, **dMeCloB** y **[Ru(dMeCloB)CO]** para estudiar su producción de $^1\text{O}_2$ al variar la concentración de oxígeno en las muestras y estudiar si nuestros compuestos seguían siendo eficientes en la producción de $^1\text{O}_2$ a bajas concentraciones de oxígeno. Las **Figuras 74** y **75** muestran los resultados obtenidos por EPR utilizando TEMP al variar la concentración de oxígeno.

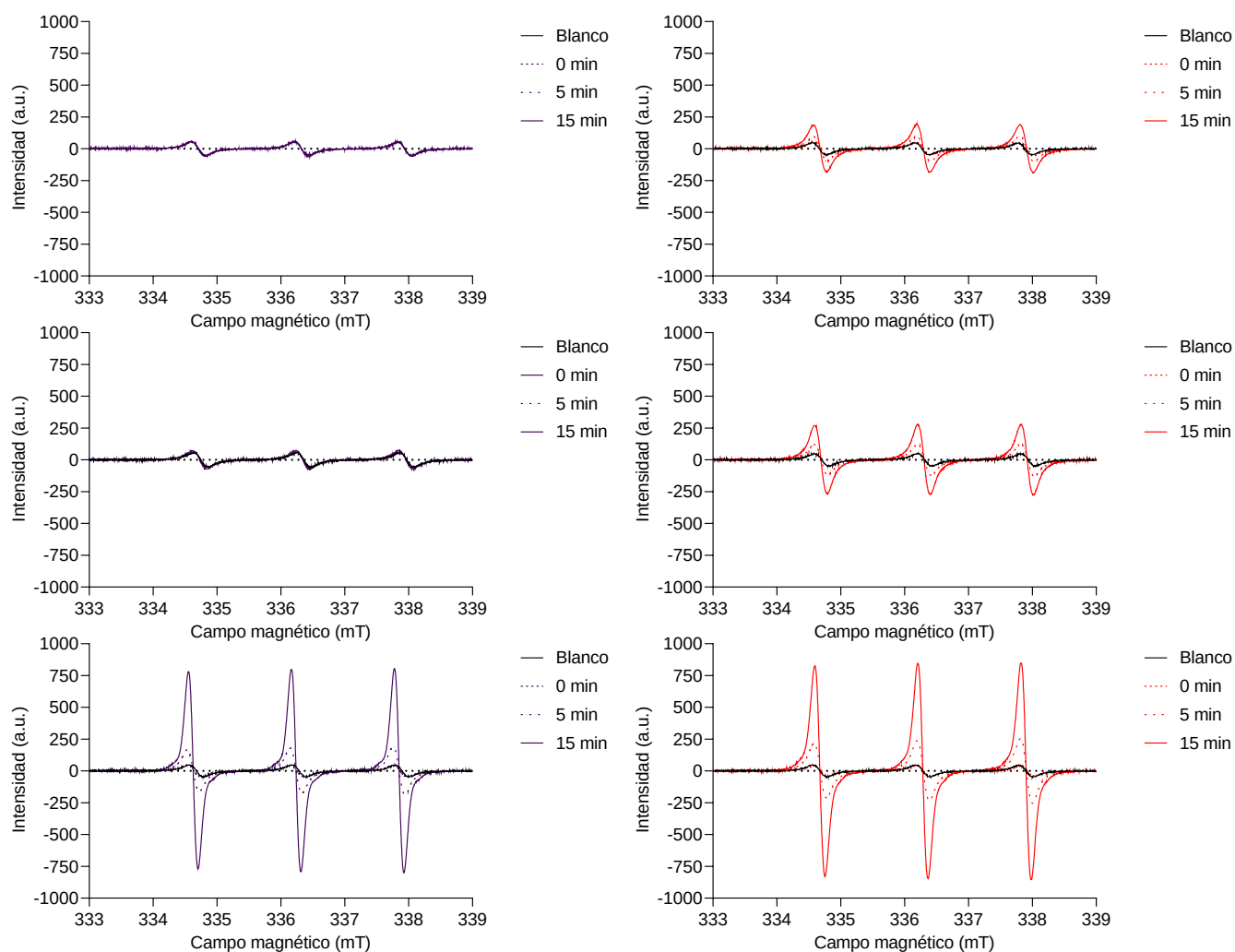


Figura 74. Espectros EPR obtenidos al variar la concentración de oxígeno para **dMePpIX** (izquierda) y **[Ru(dMePpIX)CO]** (derecha) a 5, 45 y 96 % de oxígeno de arriba hacia abajo respectivamente, usando TEMP como trampa de spin a diferentes tiempos de irradiación con luz blanca (0, 5 y 15 min).

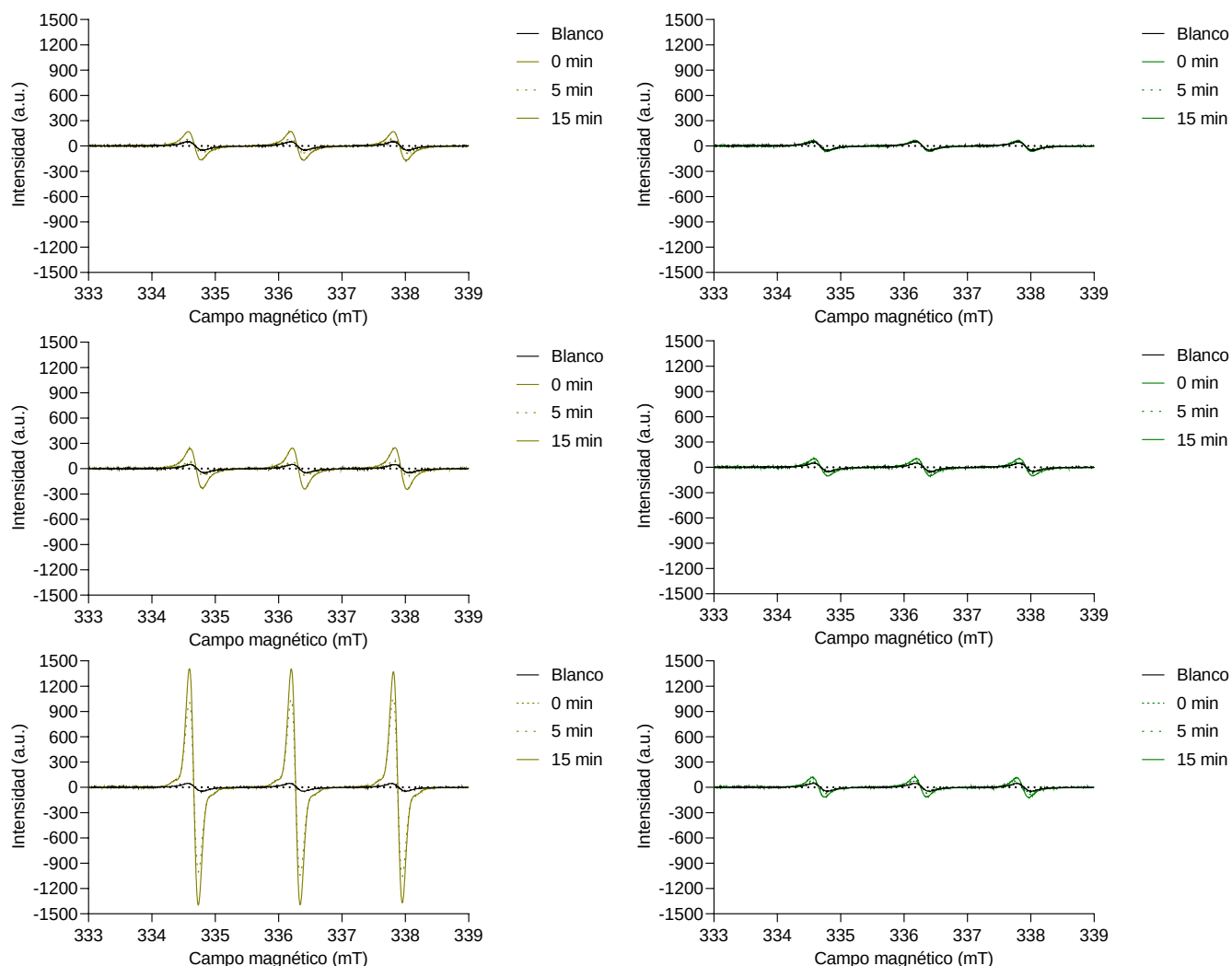


Figura 75. Espectros EPR obtenidos al variar la concentración de oxígeno para **dMeCloB** (izquierda) y **[Ru(dMeCloB)CO]** ((derecha) a 5, 45 y 96 % de oxígeno de arriba hacia abajo respectivamente, usando TEMP como trampa de spin a diferentes tiempos de irradiación con luz blanca (0, 5 y 15 min).

Como se observa en la **Figura 74**, el compuesto **[Ru(dMePpIX)CO]** puede producir TEMP a bajas concentraciones de oxígeno (45 y 5%) ya que, al compararlo con los ligandos **dMePpIX** y **dMeCloB**, la intensidad de la señal de TEMP a 5 y 45% de oxígeno es más intensa. Además, el complejo **[Ru(dMeCloB)CO]** produce mayor cantidad de TEMP que el compuesto **dMePpIX** a bajas concentraciones de oxígeno.

Estos resultados indican que posiblemente al incorporar un átomo metálico en la cavidad central de estos macrociclos se mejora el ISC mediante el acoplamiento espín-órbita (SOC) o mediante procesos de agregación,¹³⁷ mejorando la eficiencia del ISC de los PS y de esta manera mejora la producción de $^1\text{O}_2$,^{139,140} como se había mencionado anteriormente (**Sección 5.6**).

Además, se puede intuir que $[\text{Ru}(\text{dMePpIX})\text{CO}]$ y $[\text{Ru}(\text{dMeCloB})\text{CO}]$ podrían ser activos al usarse como PS en la PDT de tipo II bajo condiciones de hipoxia.

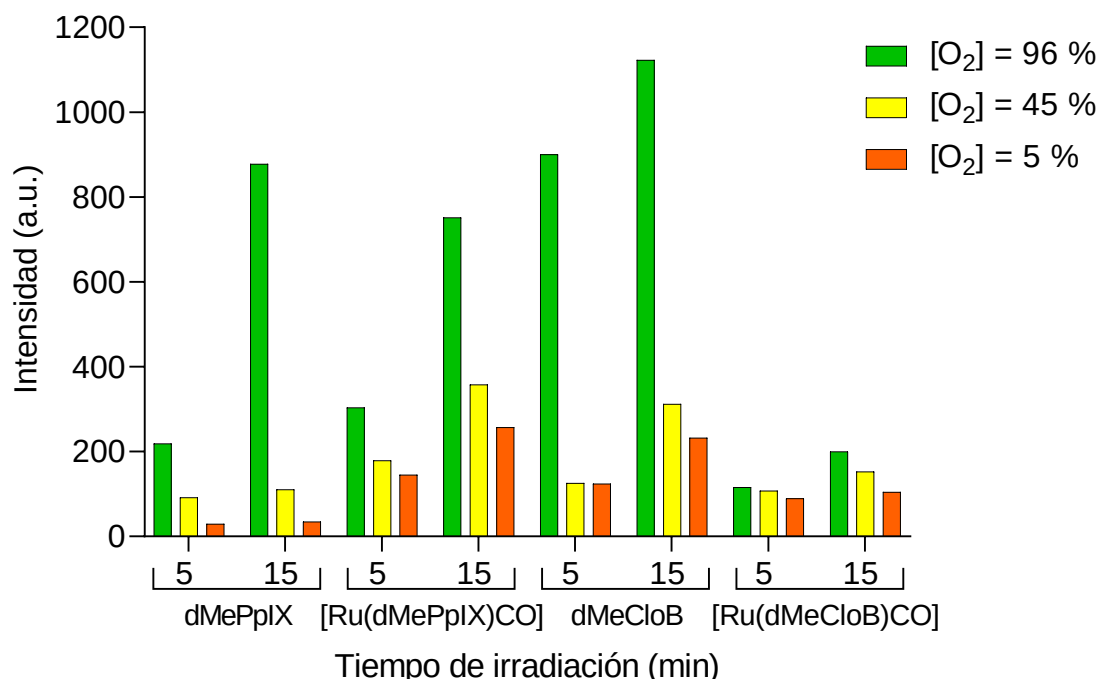


Figura 76. Intensidad de TEMPO obtenida del área bajo la curva de los espectros de EPR obtenidos tras 15 minutos de irradiación a diferentes concentraciones de oxígeno.

Se ha observado en la literatura que Tookad, (una metaloclorina de paladio) y complejos con ligantes polipiridílicos de rutenio(II) sólo actúan por el mecanismo tipo I en la PDT.^{149,150}

Debido a lo mencionado anteriormente, decidimos usar la trampa de spin llamada 5,5-dimetil-1-pirrolina-*N*-óxido (DMPO), la cual puede reaccionar con el radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) o con el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), los cuales generan señales características en EPR como se observa en la **Figura 77**.

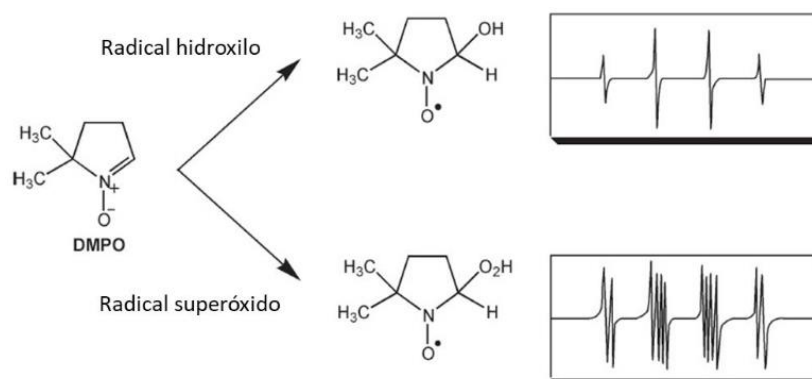


Figura 77. Aduetos formados al usar DMPO y su respectivo espectro de EPR.¹⁵¹

Mediante EPR se realizaron dos mediciones: la primera en la oscuridad y la segunda fue irradiando la muestra durante un periodo de 15 minutos en una celda de cuarzo plana con una longitud de 0.2 mm en metanol/DMSO (0.1%). La **Figura 78** muestra los espectros EPR obtenidos utilizando DMPO como trampa de espín. La **Figura 78 (a)** muestra que no hay producción de ROS en ausencia del PS. Mientras que al añadir el correspondiente PS **[Ru(dMeCloA)CO]** o **[Ru(dMeCloB)CO]** a la muestra que contiene DMPO y proceder a irradiar con luz blanca durante 15 minutos observamos la formación de una señal, característica de del aducto DMPO-O₂⁻¹⁵² (**Figuras 78 b y c**). Las señales formadas presentaron unas constantes de acoplamiento características de la especie O₂⁻ (g = 2.0060 y hfcc= 1.330 mT).¹⁵³ Las **Figuras 78 b y c** nos confirman que las metaloclorinas **[Ru(dMeCloA)CO]** y **[Ru(dMeCloB)CO]** pueden generar además de ¹O₂, el radical superóxido

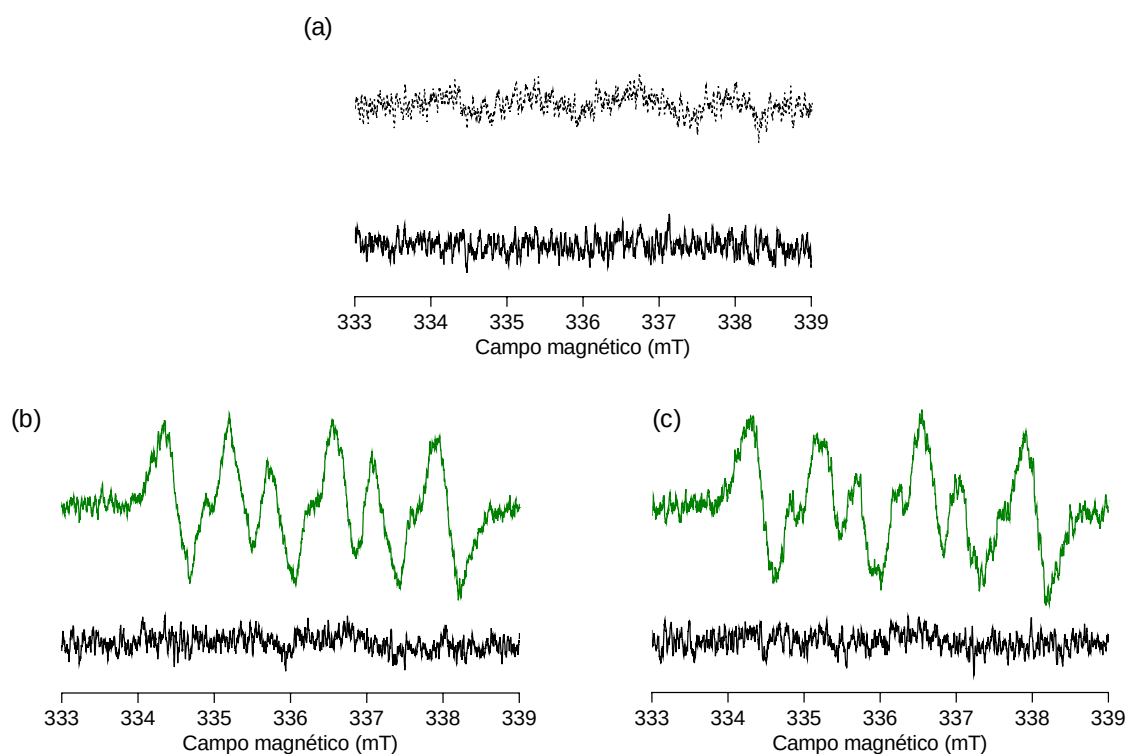


Figura 78. Espectros EPR obtenidos a temperatura ambiente a 1×10^{-3} M de PS y DMPO a 0.07 M en metanol/DMSO (0.1%) tras irradiación con luz blanca durante 15 min. (a) corresponde a la trampa DMPO en la oscuridad (línea continua) y después de la irradiación (línea de puntos), (b) **[Ru(dMeCloA)CO]** y (c) **[Ru(dMeCloB)CO]**. En todos los casos (b-c) el espectro de EPR en color verde indica el resultado obtenido después de la irradiación con luz blanca y el espectro en color negro corresponde al resultado sin ser irradiado.

Con el fin de corroborar que solo las metaloclorinas **[Ru(dMeCloA)CO]** y **[Ru(dMeCloB)CO]** podían generar ROS diferente al ¹O₂, decidimos estudiar si los compuestos **[Ru(dMePpIX)CO]** y **dMeCloB** en presencia de DMPO podrían producir alguna señal característica .

En la **Figura 79** se observa que bajo las mismas condiciones que se realizaron los experimentos para $[\text{Ru}(\text{dMeCloA})\text{CO}]$ y $[\text{Ru}(\text{dMeCloB})\text{CO}]$, los compuestos $[\text{Ru}(\text{dMePpIX})\text{CO}]$ y dMeCloB no son eficientes al generar el radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), ya que el espectro de EPR obtenido después de 15 min de irradiación con luz blanca muestra una señal con poca intensidad en comparación con los espectros de EPR mostrados en la **Figura 78**.

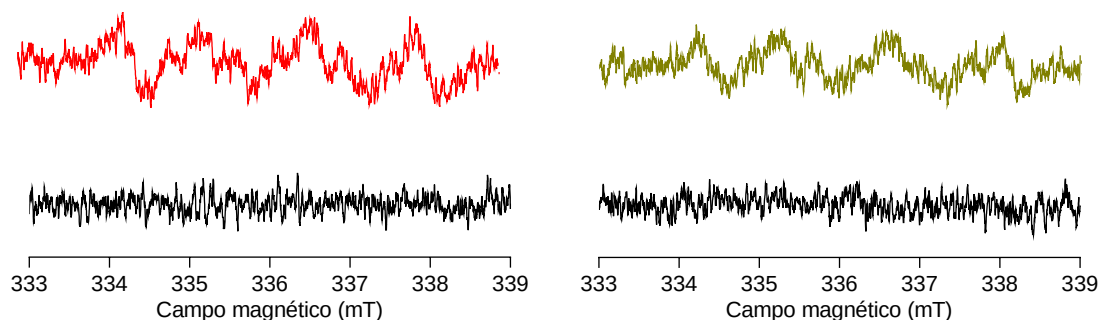


Figura 79. Espectros EPR obtenidos a temperatura ambiente a 1×10^{-3} M de PS y DMPO a 0.07 M en metanol/DMSO (0.1%) tras irradiación con luz blanca durante 15 min para $[\text{Ru}(\text{dMePpIX})\text{CO}]$ (izquierda) y dMeCloB (derecha). En ambos casos el espectro en negro hace referencia al experimento antes de la irradiación.

De estos resultados podemos deducir que todos los compuestos podrían ser eficientes al usarse como PS en la PDT tipo II al ser irradiados con luz blanca, ya que todos demostraron tener alta fotogeneración de $^1\text{O}_2$. Además, los complejos $[\text{Ru}(\text{dMeCloA})\text{CO}]$ y $[\text{Ru}(\text{dMeCloB})\text{CO}]$ presentaron la capacidad de producir $\text{O}_2^{\cdot-}$ lo cual representa un excelente resultado ya que la formación del radical superóxido no depende de la concentración de oxígeno.

5.9 Evaluación de la citotoxicidad

Durante el desarrollo de este proyecto se realizaron 3 estancias de investigación en la universidad de Strasbourg (Francia) en los laboratorios del Dr. Georg Mellitzer y Christian Gaidon.

Todos los estudios biológicos mostrados en esta sección se realizaron durante las estancias en Strasbourg.

Para evaluar la actividad citotóxica de los compuestos se llevaron a cabo ensayos MTT, centrándonos en el cáncer gástrico ya que es un problema de salud pública en todo el mundo debido a su alta agresividad. El cáncer gástrico representa la quinta causa de muerte relacionada con el cáncer en el mundo.¹⁵⁴ Por dichas razones se seleccionó la línea celular de cáncer gástrico AGS. Las células AGS se trataron en la oscuridad durante 8 horas con las diferentes concentraciones de los compuestos. A continuación, se irradiaron o no las células durante 15 minutos con una fuente de luz blanca y se realizó el ensayo MTT después de 48 horas de incubación para medir la supervivencia celular. Se utilizó cisplatino como fármaco citotóxico positivo y de control clínico, así como VP y PpIX (Protoporfirina-IX) como controles positivos. Los datos de IC_{50} se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Concentraciones inhibitorias medias (IC_{50}) de los compuestos en células de cáncer gástrico AGS. Las células se incubaron durante 8 h, seguidas de irradiación con luz blanca durante 15 min o se mantuvieron en condiciones de oscuridad. Se realizó el ensayo MTT para determinar la viabilidad celular tras 48 h después del tratamiento.

Compuesto	IC_{50} (μM)		PI
	Luz	Oscuridad	
Cisplatino	-	29	-
PpIX	0.5	> 100	> 200
VP	0.003	7	= 13270
dMePpIX	1.7 ± 0.184	> 100	> 17
[Ru(dMePpIX)CO]	3.8 ± 0.379	95 ± 0.462	= 25
dBnPpIX	2.6 ± 0.100	> 100	> 18
[Ru(dBnPpIX)CO]	51.3 ± 1.249	> 100	> 2
dMeCloA	0.1 ± 0.061	> 100	>1000
[Ru(dMeCloA)CO]	1.7 ± 0.100	64.1 ± 0.815	= 38
dMeCloB	0.2 ± 0.021	> 100	> 555
[Ru(dMeCloB)CO]	3.2 ± 0.252	> 100	> 31
dBnCloA	2.5 ± 0.231	> 100	> 40
dBnCloB	2.8 ± 0.265	> 100	> 36

Los experimentos se realizaron por triplicado

PI: índice de fototoxicidad y se calcula mediante la ecuación $IC_{50}Oscuridad/IC_{50}Luz$

En la **Tabla 9** se observa que, en contraste con el cisplatino (IC_{50} de 29 μM) y la VP (IC_{50} de 7 μM), todos los compuestos estudiados, mostraron valores de IC_{50} en la oscuridad entre 64 y 95 μM o en algunos casos no fue posible calcular su IC_{50} (>100 μM) ya que no mostraron toxicidad. Tras la irradiación, todos los compuestos, excepto **[Ru(dBnPpIX)CO]**, mostraron un marcado aumento de su toxicidad con IC_{50} por debajo de la del cisplatino, oscilando entre 0.1 μM y 4 μM . Además, al calcular el índice de fototoxicidad (IP) mediante la relación IC_{50} oscuridad/luz obtuvimos altos valores que sugieren que los compuestos sintetizados podrían usarse como posibles PS para tratar el cáncer mediante la PDT.¹⁵⁵ En las **Figuras 80-84**, se presentan las curvas de viabilidad celular de los compuestos evaluados en células AGS.

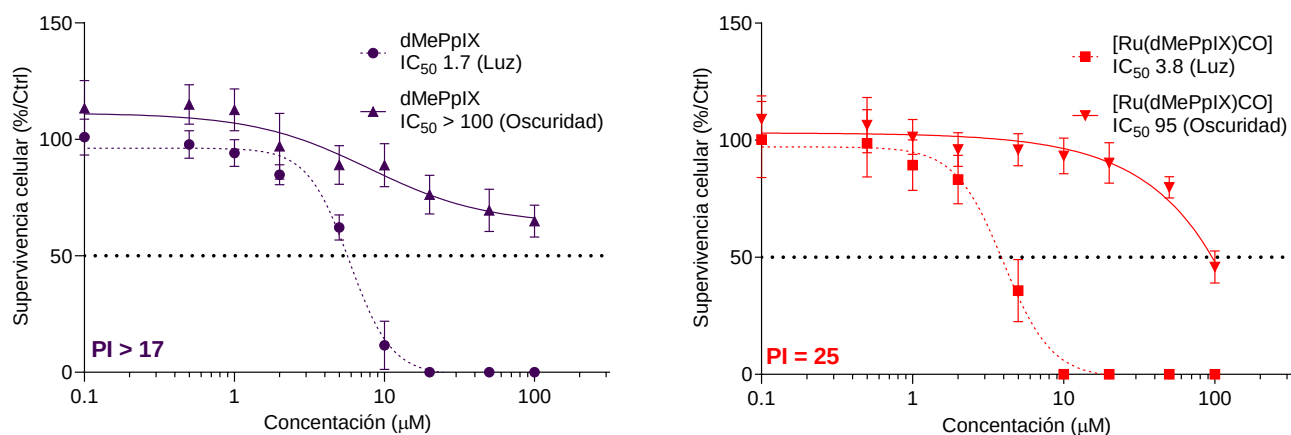


Figura 80. Curvas de viabilidad celular para los compuestos **dMePpIX** (izquierda) y **[Ru(dMePpIX)CO]** (derecha) en la línea celular AGS.

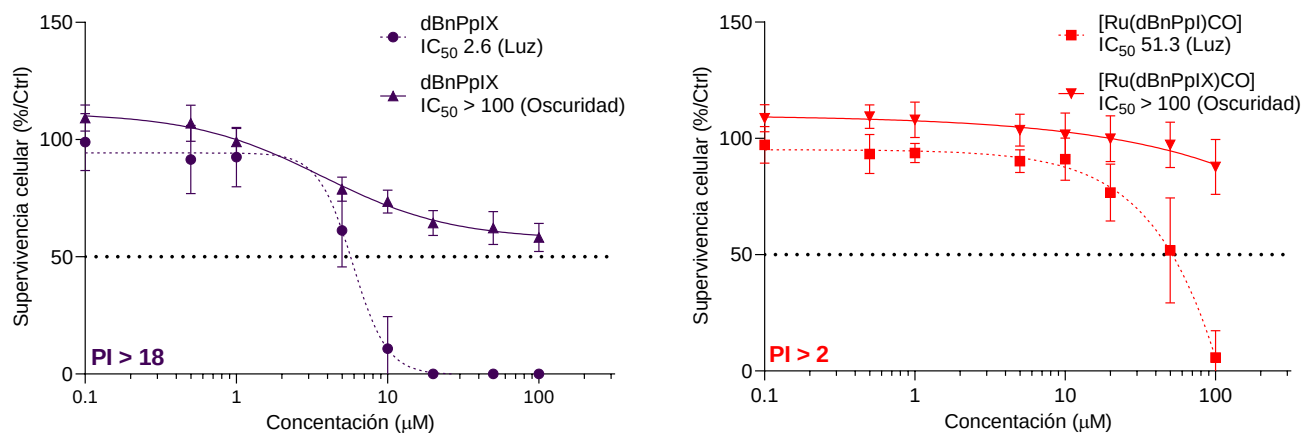


Figura 81. Curvas de viabilidad celular para los compuestos **dBnPpIX** (izquierda) y **[Ru(dBnPpIX)CO]** (derecha) en la línea celular AGS.

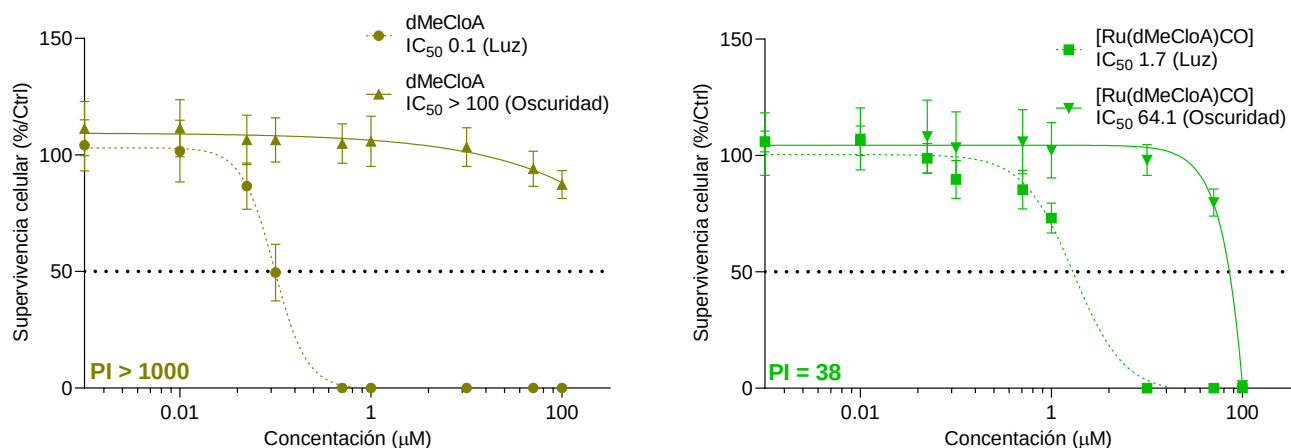


Figura 82. Curvas de viabilidad celular para los compuestos **dMeCloA** (izquierda) y **[Ru(dMeCloA)CO]** (derecha) en la línea celular AGS.

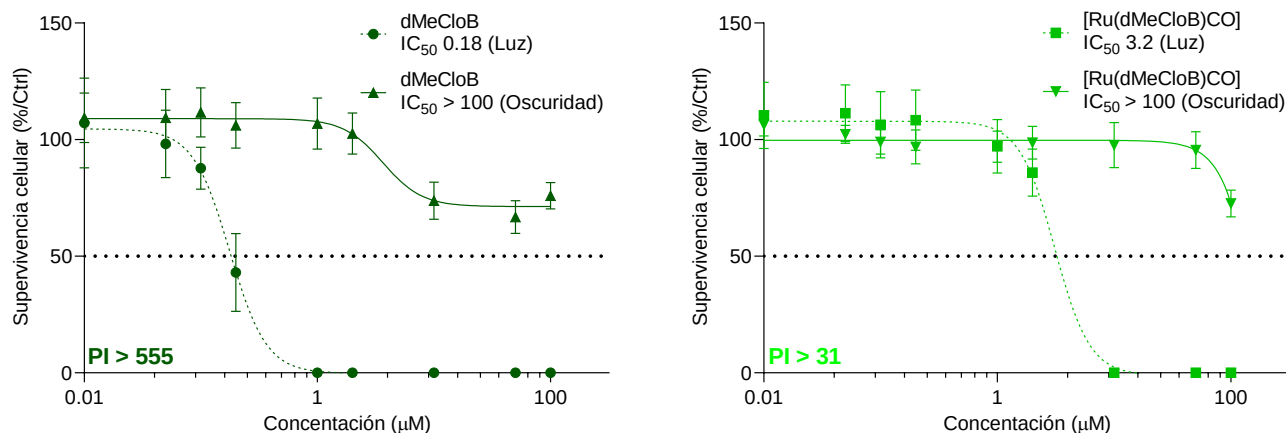


Figura 83. Curvas de viabilidad celular para los compuestos **dMeCloB** (izquierda) y **[Ru(dMeCloB)CO]** (derecha) en la línea celular AGS.

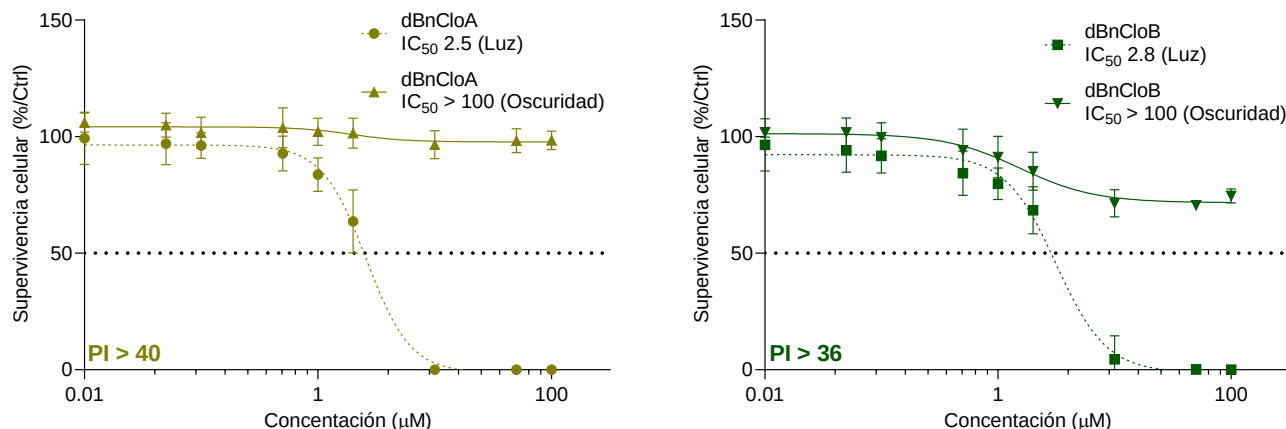


Figura 84. Curvas de viabilidad celular para los compuestos, **dBnCloA** (izquierda) y **dBnCloB** (derecha) en la línea celular AGS.

En la **Figura 81** se observa que el compuesto **[Ru(dBnPpIX)CO]** resultó ser el menos citotóxico, lo cual era un resultado de esperarse ya que, aunque la producción de oxígeno singlete de dicho compuesto fue efectiva, los resultados en los experimentos de estabilidad en el medio biológico PBS observado en la **Figura 48**, demuestra que en 8 horas **[Ru(dBnPpIX)CO]** se ha precipitado en un 48%.

5.10 Influencia de la producción de $^1\text{O}_2$ sobre la actividad citotóxica

Tomando en cuenta los resultados de citotoxicidad, se llevó a cabo un análisis para determinar como la producción de TEMPO después de la irradiación con luz blanca por 15 minutos puede influir en la citotoxicidad de cada compuesto. Para este estudio cabe mencionar que los valores tomados de IC_{50} , fueron los obtenidos después de irradiar el medio por 15 minutos con luz blanca.

Las metaloclorinas **[Ru(dMeCloA)CO]** y **[Ru(dMeCloB)CO]** no se tomaron en cuenta en este análisis, ya que, como se discutió en la **Sección 5.8**, la producción de $^1\text{O}_2$ es baja y, además, pueden producir otro tipo de ROS.

En la **Figura 85** se observa que la producción de TEMPO y la citotoxicidad están relacionadas. Es decir que a mayor producción de $^1\text{O}_2$ se observan valores de IC_{50} bajos. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que la citotoxicidad no es solo atribuida a la capacidad que tiene los compuestos para producir $^1\text{O}_2$ ya que la citotoxicidad también está dada por otros mecanismos de acción que cada compuesto puede desencadenar dentro de la célula cancerosa.

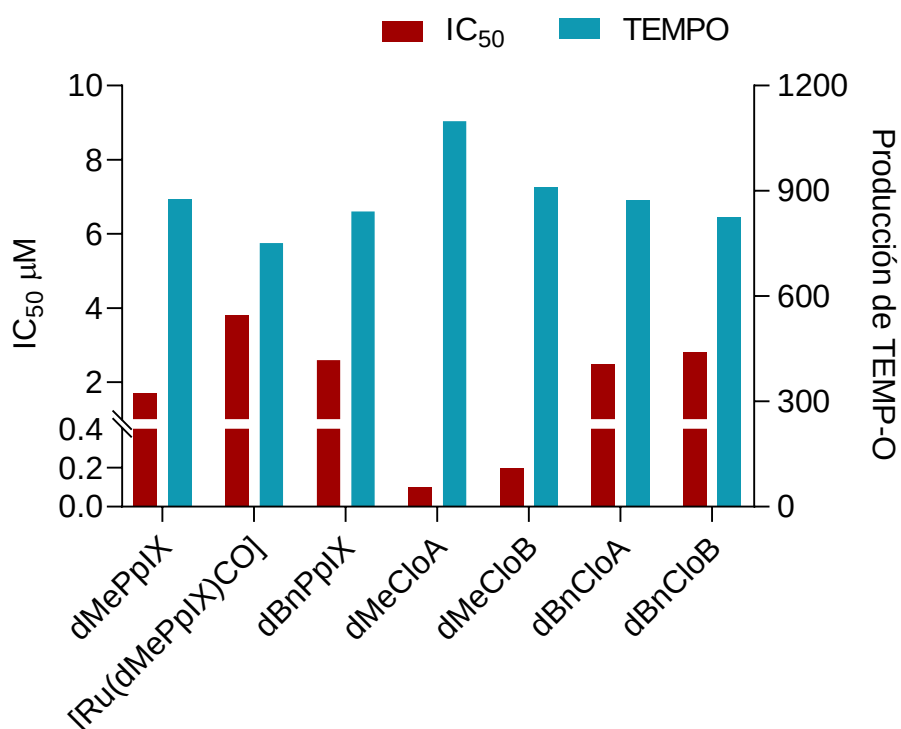


Figura 85. Relación entre producción de TEMPO y la citotoxicidad.

En vista de los resultados obtenidos en la **Sección 5.9**, los compuestos **dMePpIX**, **[Ru(dMePpIX)CO]**, **dMeCloB** y **[Ru(dMeCloB)CO]** fueron seleccionados como compuestos principales para estudiar las posibles vías de acción que estos compuestos podrían tener en las células AGS.

5.11 Posibles vías de acción

Como se ha mencionado, los principales efectos terapéuticos de la PDT sobre las células cancerosas están relacionados primordialmente con la producción de ROS.¹⁵⁶ Se sabe que las ROS son altamente reactivas y citotóxicas y pueden conducir a la muerte celular por apoptosis. Por este motivo, decidimos medir la expresión de algunas proteínas relacionadas con la apoptosis, como PARP escindida, caspasa 3 escindida y el marcador proteico del estrés del retículo endoplásmico (RE) CHOP.

La expresión de las proteínas seleccionadas para estudiar la apoptosis se midió mediante Western blot. Para ello, se extrajeron las proteínas totales de las células AGS que y tratadas con de cada compuesto a la concentración de IC₅₀.

En la **Figura 86** se observa que, en condiciones de oscuridad, no hay expresión de la caspasa 3 escindida ni de la PARP escindida, mientras que, al irradiar las células observamos que los compuestos **dMePpIX**, **[Ru(dMePpIX)CO]**, **dMeCloB**, **[Ru(dMeCloB)CO]** y **VP** inducen notablemente la expresión de la caspasa 3 escindida, lo cual podría dar lugar a la escisión de PARP y de esta manera desencadenar procesos de apoptosis.

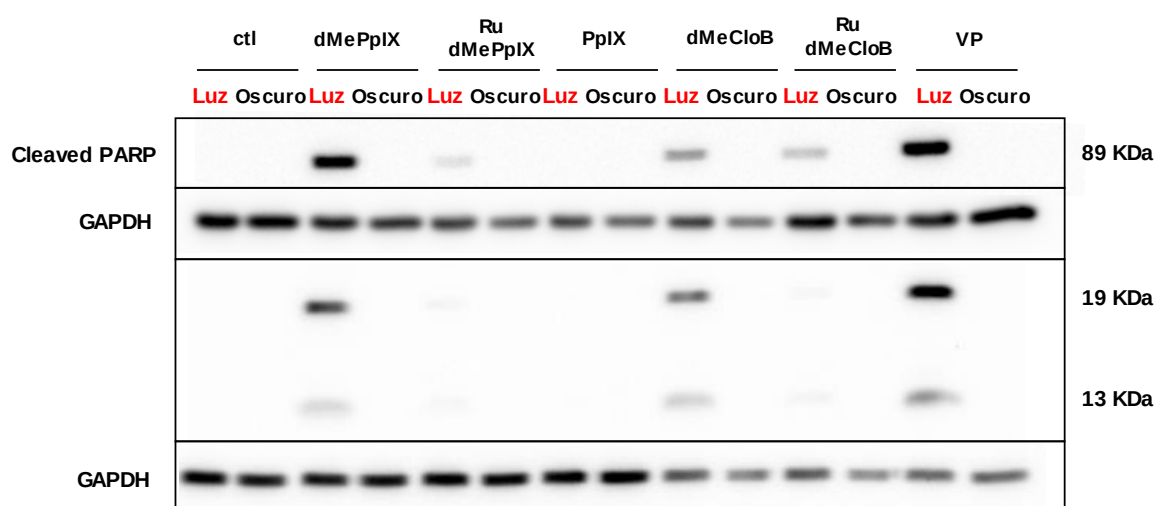


Figura 86. Efectos de la fotoactivación de **dMePpIX**, **[Ru(dMePpIX)CO]**, **dMeCloB** y **[Ru(dMeCloB)CO]** en la expresión de marcadores apoptóticos en células de cáncer gástrico AGS. Las células AGS se sembraron en placas de 6 pocillos (densidad 125.000) y se cultivaron durante 24 h, después se trataron con los respectivos compuestos a concentraciones de IC₅₀. Tras 8 h de incubación, se sustituyó el medio de cultivo y las células se irradiaron o no se irradiaron durante 15 min con luz blanca. Se realizó la extracción de proteínas y se determinó la expresión proteica mediante Western blot. Se utilizó GAPDH como control de carga.

Por otro lado, CHOP juega un papel importante en la respuesta al estrés del retículo endoplásmico (RE) y está involucrado en la apoptosis mediada por ROS a través de la oxidación avanzada de los lípidos.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹

Figura 87 muestra que los compuestos **dMePpIX**, **[Ru(dMePpIX)CO]**, **dMeCloB**, **[Ru(dMeCloB)CO]** y **VP** inducen la expresión de CHOP después de ser activados con luz blanca. Sin embargo, la expresión de CHOP fue mucho más fuerte por los compuestos **[Ru(dMePpIX)CO]** y **[Ru(dMeCloB)CO]** en comparación con sus respectivos ligandos o incluso más fuerte que la verteporfina. Este resultado indica que posiblemente los compuestos a base de Ru pueden provocar estrés del RE.^{159,160}

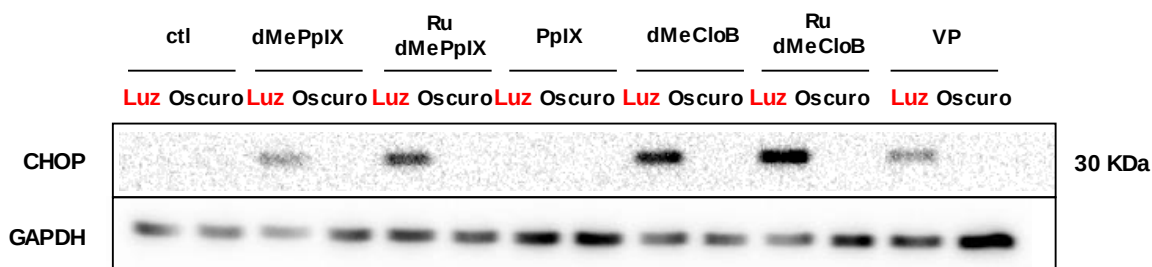


Figura 87. Efectos de la fotoactivación de **dMePpIX**, **[Ru(dMePpIX)CO]**, **dMeCloB** y **[Ru(dMeCloB)CO]** en la expresión de CHOP en células de cáncer gástrico AGS. Las células AGS se sembraron en placas de 6 pocillos (densidad 125.000) y se cultivaron durante 24 h, después se trataron con los respectivos compuestos a concentraciones de IC₅₀. Tras 8 h de incubación, se sustituyó el medio de cultivo y las células se irradiaron o no se irradiaron durante 15 min con luz blanca. Se realizó la extracción de proteínas y se determinó la expresión proteica mediante Western blot. Se utilizó GAPDH como control de carga.

Por otro lado, la autofagia es un sistema de autodegradación celular que facilita la descomposición de orgánulos dañados y proteínas mal plegadas.¹⁶¹ Por lo tanto, la autofagia se considera como otra vía de muerte celular. La autofagia se caracteriza por la formación de autofagosomas que expresan proteínas LC3B, las cuales pueden identificarse mediante la conversión de LC3B-I a LC3B-II mediante Western blot.¹⁶² Los resultados mostrados en la **Figura 78** indican que tras la irradiación, todos los compuestos seleccionados inducen la expresión de LC3B-I y su conversión a LC3B-II, indicando que son capaces de inducir autofagia.

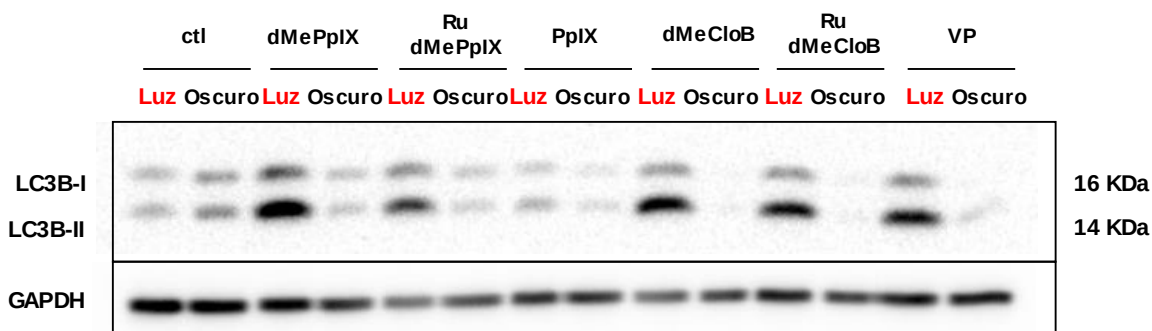


Figura 78. Efectos de la fotoactivación de **dMePpIX**, **[Ru(dMePpIX)CO]**, **dMeCloB** y **[Ru(dMeCloB)CO]** en la expresión de LC3B en células de cáncer gástrico AGS. Las células AGS se sembraron en placas de 6 pocillos (densidad 125.000) y se cultivaron durante 24 h, después se trataron con los respectivos compuestos a concentraciones de IC₅₀. Tras 8 h de incubación, se sustituyó el medio de cultivo y las células se irradiaron o no se irradiaron durante 15 min con luz blanca. Se realizó la extracción de proteínas y se determinó la expresión proteica mediante Western blot. Se utilizó GAPDH como control de carga.

Otro tipo de muerte celular no apoptótica es la ferroptosis, la cual puede promover la inflamación. Se desencadena por la peroxidación lipídica catalizada por el hierro mediante una reacción de tipo Fenton, en la que los principales ROS responsables del daño lipídico son el radical hidroxilo y el radical superóxido.^{163,164} Por lo tanto, la

ferroptosis está emergiendo como un supresor tumoral importante y una estrategia de tratamiento potencialmente efectiva para superar la resistencia de las células cancerosas a los tratamientos estándar.¹⁶⁵ Una proteína muy usada para estudiar si la ferroptosis se activa en las células cancerosas es la glutatión peroxidasa (GPX4), la cual posee la capacidad única de suprimir la peroxidación lipídica y proteger a las células de la ferroptosis.¹⁶⁶ En consecuencia, la ferroptosis se activa cuando ocurre una inactivación de GPX4, es decir, cuando los niveles de GPX4 disminuyen.¹⁶⁷ En la **Figura 79** se observa que todos los compuestos seleccionados pueden inhibir la expresión de GPX4, especialmente el compuesto **[Ru(dMeCloB)CO]**. Probablemente, la disminución de la expresión de GPX4 se debe a las ROS producidas (principalmente $O_2^{\cdot-}$ o $\cdot OH$) que pueden iniciar procesos de peroxidación lipídica como mencionado anteriormente. Además, se observa que el compuesto **[Ru(dMeCloB)CO]** presenta la mayor inhibición de GPX4, lo que podría confirmar que **[Ru(dMeCloB)CO]** actúa en la PDT de tipo I como se mencionó en la sección 5.8.

La **Figura 79** representa la cuantificación de las señales obtenidas en los Western blots.

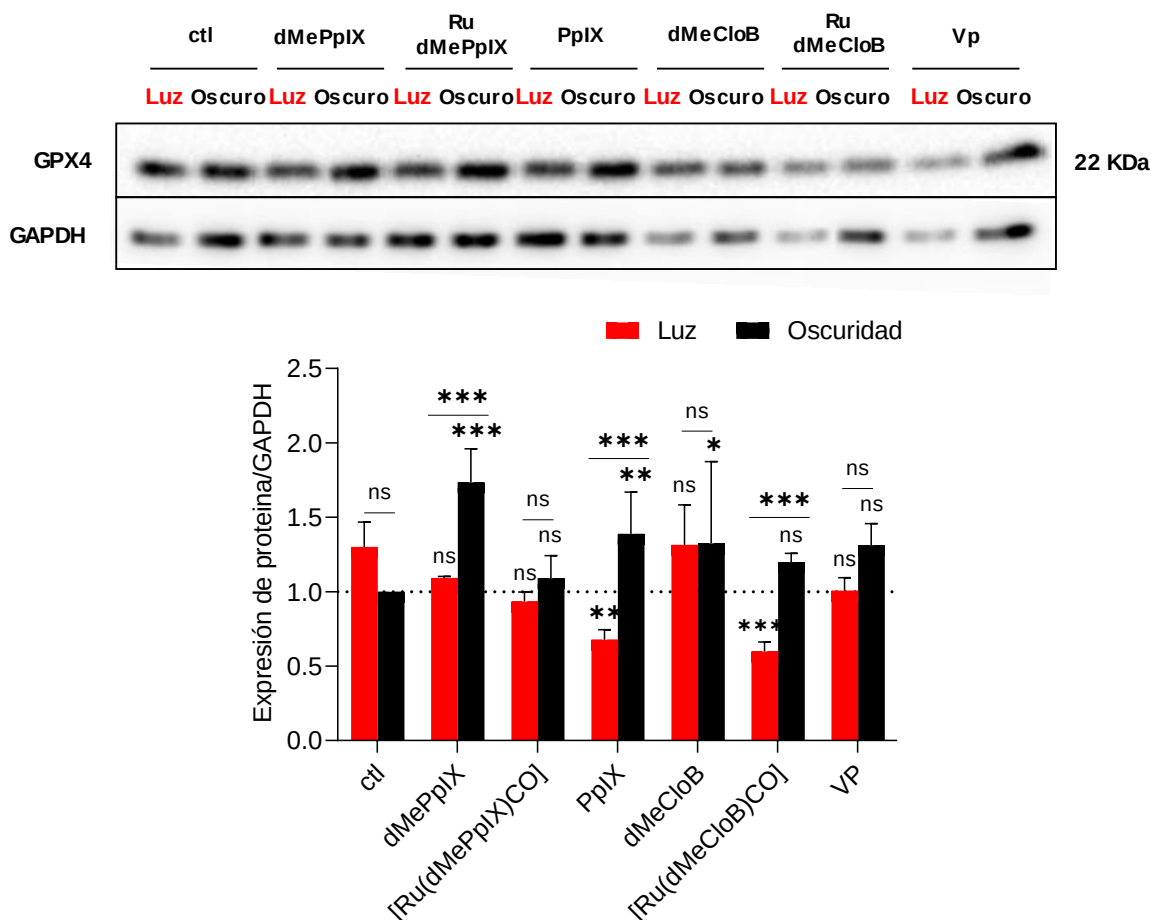


Figura 79. Efectos de la fotoactivación de **dMePpIX**, **[Ru(dMePpIX)CO]**, **dMeCloB** y **[Ru(dMeCloB)CO]** en la expresión de GPX4 en células de cáncer gástrico AGS.

Las células AGS se sembraron en placas de 6 pocillos (densidad 125.000) y se cultivaron durante 24 h, después se trataron con los respectivos compuestos a concentraciones de IC_{50} . Tras 8 h de incubación, se sustituyó el medio de cultivo y

las células se irradiaron o no se irradiaron durante 15 min con luz blanca. Se realizó la extracción de proteínas y se determinó la expresión proteica mediante Western blot. Se utilizó GAPDH como control de carga. Los resultados en oscuridad y luz de cada compuesto se compararon con los de la respectiva condición de control no tratada (ctl). Análisis estadístico: Anova de 2 vías * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$, ns = no significativo.

Finalmente, se deseó evaluar si nuestros compuestos podían inducir inflamación y conducir a la muerte celular no apoptótica mediante este proceso. Para estudiar este tipo de muerte celular, se usó la enzima COX2, la cual es un regulador clave en la respuesta al estrés del retículo endoplásmico. Cuando ocurre un daño severo en el RE, se activa COX2, la cual puede contribuir a la activación de respuestas inflamatorias y por lo tanto activar mecanismos de muerte celular.¹⁶⁸ La enzima COX2 muestra una expresión escasa o nula en condiciones fisiológicas normales, pero en las células cancerosas se sobre expresa.¹⁶⁹ Normalmente, la enzima COX2 ayuda a la proliferación de genes que promueven el crecimiento celular a través de un proceso de angiogénesis.¹⁷⁰ Por lo tanto, la inhibición de la COX2 es de gran importancia para detener el desarrollo del cáncer. En la **Figura 80** se puede observar que los compuestos seleccionados **dMePpIX**, **[Ru(dMePpIX)CO]**, **dMeCloB**, **[Ru(dMeCloB)CO]** pueden disminuir la expresión de COX2.¹⁷¹

La **Figura 80** representa la cuantificación de las señales obtenidas en el Western blot

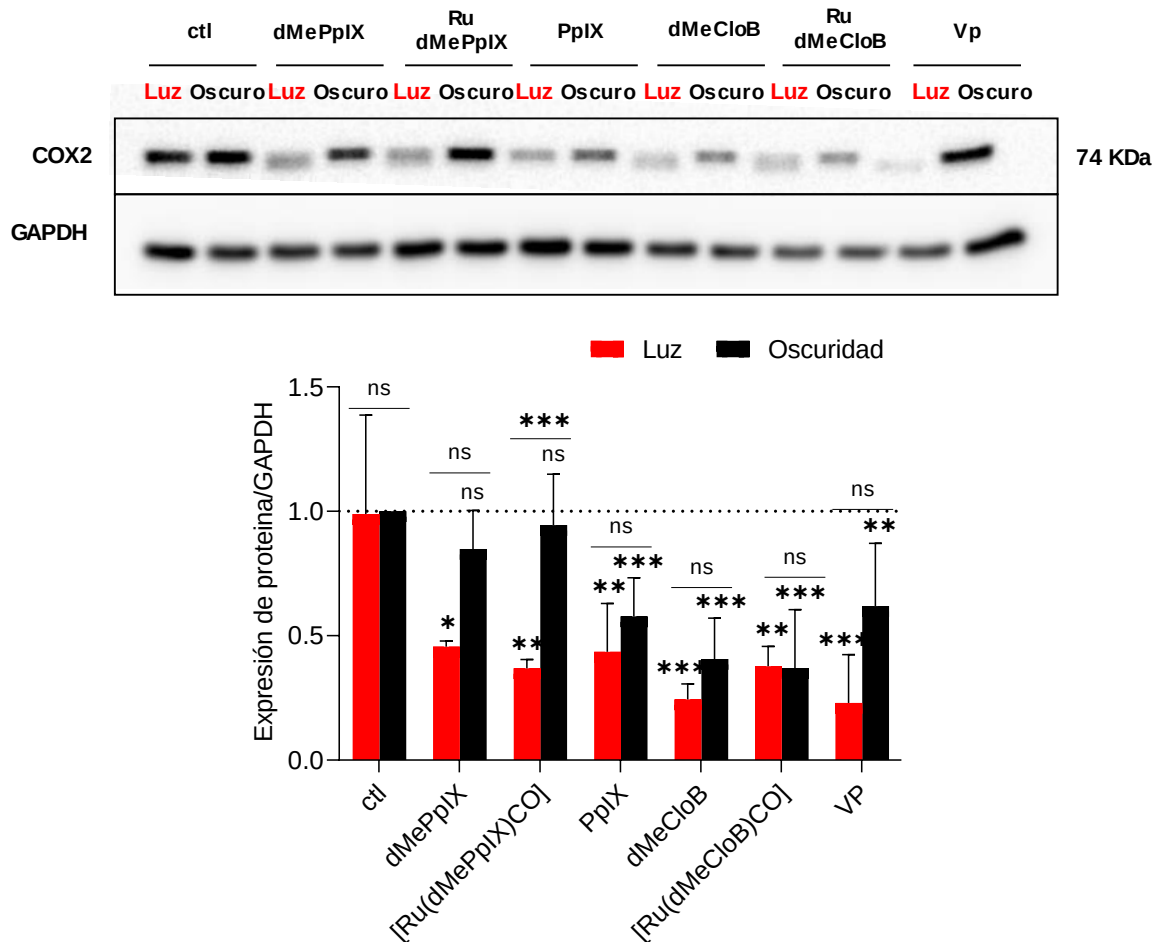


Figura 100. Efectos de la fotoactivación de **dMePpIX**, **[Ru(dMePpIX)CO]**, **dMeCloB** y **[Ru(dMeCloB)CO]** en la expresión de COX2 en células de cáncer gástrico AGS. Las células AGS se sembraron en placas de 6 pocillos (densidad 125.000) y se cultivaron durante 24 h, después se trataron con los respectivos compuestos a concentraciones de IC₅₀. Tras 8 h de incubación, se sustituyó el medio de cultivo y las células se irradiaron o no se irradiaron durante 15 min con luz blanca. Se realizó la extracción de proteínas y se determinó la expresión proteica mediante Western blot. Se utilizó GAPDH como control de carga. Los resultados en oscuridad y luz de cada compuesto se compararon con los de la respectiva condición de control no tratada (ctl). Análisis estadístico: Anova de 2 vías * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$, ns = no significativo.

6. CONCLUSIONES

- Se logró sintetizar en rendimientos moderados, una serie de ligantes derivados de la protoporfira IX y de la verteporfina. Durante la síntesis de los derivados de la verteporfina se obtuvo una mezcla de isómeros los cuales se separaron de manera satisfactoria.
- La reacción entre los ligantes y $\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}$ permitió la síntesis de las metaloporfirinas y metaloclorinas correspondientes
- Todos los compuestos sintetizados demostraron ser altamente citotóxicos en células de cáncer gástrico AGS después de ser irradiados con luz blanca por 15 minutos, salvo el compuesto **[Ru(dBnPpIX)CO]**. El cual, gracias a las pruebas de estabilidad en PBS se logró determinar que dicha metaloporfina no es estable en condiciones biológicas. Además, se encontró que los valores de IC_{50} obtenidos sin irradiar en varios casos fueron superiores a $100\ \mu\text{M}$, lo cual hace que todos los compuestos estudiados en este trabajo puedan funcionar como posibles fotosensibilizadores en la terapia fotodinámica.
- Se logró determinar que todos los compuestos pueden producir oxígeno singulete, además, mediante la oxidación de DPBF se determinó el rendimiento cuántico de cada compuesto. Mejor comparar con VP
- Mediante experimentos por EPR se corroboró que todos los compuestos producen oxígeno singulete. Además, se determinó que el incremento de la citotoxicidad está relacionado con la producción de oxígeno singulete.
- Mediante experimentos por EPR se confirmó que las metaloclorinas **[Ru(dMeCloA)CO]** y **[Ru(dMeCloB)CO]** son capaces de producir el radical superóxido, lo cual es de gran importancia ya que la producción de esta ROS no depende directamente de la concentración de oxígeno en el medio.
- Mediante experimentos por EPR a diferentes concentraciones de oxígeno se logró determinar que los complejos **[Ru(dMePpIX)CO]** y **[Ru(dMeCloB)CO]** pueden seguir produciendo $^1\text{O}_2$ a bajas concentraciones de oxígeno, siendo este resultado de gran importancia ya que indica los compuestos **[Ru(dMePpIX)CO]** y **[Ru(dMeCloB)CO]** podrían seguir presentando buena actividad citotóxica en condiciones de hipoxia.
- Finalmente, por medio de ensayos tipo Western blot y mediante la selección de varias proteínas específicas, se determinó que la actividad citotóxica de los compuestos seleccionados está dada por varios mecanismos de acción como el estrés del retículo endoplásmico, autofagia, ferroptosis e inflamación. De esta manera se podría considerar que una posible forma de evitar los mecanismos de resistencia de las células cancerosas es que los fármacos presenten varios mecanismos de acción.

7. SECCIÓN EXPERIMENTAL

7.1 Reactivos

La sal disódica de protoporfirina IX (98%), el acetilenodicarboxilato de dimetilo (99%), el alcohol bencílico (99%), el sulfato de sodio (Na_2SO_4 - 99%), la verteporfina, el ácido sulfúrico (H_2SO_4 - 99%), el bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y la 2,2,6,6-tetrametilpiperidina fueron obtenidos de Sigma-Aldrich y se emplearon sin ningún tratamiento previo. El tricloruro de rutenio (RuCl_3) que fue adquirido en Pressure Chemicals. El precursor de rutenio [$\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}$] se preparó según los procedimientos descrito en la literatura.¹⁷²

7.2 Disolventes

Los disolventes fueron obtenidos de Sigma-Aldrich y secados con su respectivo agente desecante antes de su uso. Se empleó como disolvente: cloroformo (CHCl_3) anhidro, diclorometano (CH_2Cl_2) grado reactivo, *n*-hexano, acetato de etilo (AcOEt), acetona, benceno y metanol (MeOH). Se usaron de manera inmediata después de la purificación.

7.3 Equipos

Todas las reacciones se realizaron bajo atmosfera de nitrógeno con la ayuda de líneas mixtas vacío/argón usando las técnicas de

Los espectros infrarrojos se registraron en un espectrómetro FT-IR ATR PerkinElmer Frontier.

Los espectros de masas (MS-FAB^+) se obtuvieron utilizando un instrumento JEOLJMS-SX102A usando alcohol *m*-nitrobencílico como matriz. La espectrometría de masas de ionización por electronebulización (MS-ESI) se realizó utilizando un espectrómetro de masas Bruker Esquire.

Los espectros de RMN (1D y 2D) se registraron en un espectrómetro Bruker Advance a 300 MHz para el protón y 75 MHz para el carbono. Los patrones de división de los espectros de RMN se designaron como s (singulete), d (doblete) o m (multiplete). Todos los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón y las constantes de acoplamiento (*J*) en hercios (Hz).

La absorbancia de los compuestos se midió en un espectrofotómetro UV-Vis 2600 Shimadzu utilizando celdas de cuarzo de 1 mm de longitud. Todas las mediciones se realizaron a una temperatura de 37 °C con la ayuda de un controlador de temperatura.

Los espectros de fluorescencia se registraron en un espectrofotómetro Agilent modelo Varian Cary Eclipse 100 en celdas de cuarzo.

Las determinaciones de resonancia paramagnética de electrones (EPR) se llevaron a cabo en un espectrómetro EPR (Jeol JES-TE300), operado en el modo de Banda X a una frecuencia de modulación de 100 KHz con una cavidad cilíndrica (TE₀₁₁). Cada muestra se colocó en una celda plana de cuarzo (Wilma Glass Company) y se irradió *in situ*. La adquisición y manipulación se realizaron con el programa ES-IPRIT/TE. La fotogeneración de ¹O₂ se realizó con una lámpara de arco de 500 Hg (Oriel OPS-A500), las muestras se irradiaron continuamente a 160 W durante 15 minutos.

La difracción de rayos X de monocristal se llevó a cabo por un difractómetro de Monocristal Bruker-APEX con un detector de área CCD y un monocromador de grafito ($\lambda_{\text{MoK}\alpha} = 0.71073\text{\AA}$).

La pureza de los compuestos se midió en un HPLC en un cromatógrafo de líquidos acoplado a UV-Vis modelo Agilent 1200 con arreglo de diodos Waters 2996 y una columna Eclipse Plus C18 (3.5 μm $\times$ 2.1 mm).

Para la manipulación celular se utilizó un equipo de flujo laminar PSM Flux Laminar Herasafe KS ThermoScientific Tipo KS12. Para el mantenimiento de las células se utilizó una incubadora marca Thermo Scientific Serie800 WJ. Para la cuantificación de los resultados de viabilidad celular se utilizó un equipo TrisStar Multimode Reader LB 942 marca Berthold Technologies.

Para centrifugar las muestras se utilizaron los equipos VWR MicroStar 17R y Eppendorf centrifuge 5810. Para la visualización de las células se utilizaron los microscopios de la marca Lavobert Microscope, Zeiss Axio y Apotome Zeiss.

Las bandas proteicas mostradas en el en los experimentos de Western blot se visualizaron en un equipo Syngene PXi utilizando el software GeneSys y las bandas de las proteínas se cuantificaron utilizando el software ImageJ.

7.4 Síntesis de compuestos orgánicos

7.4.1 Síntesis del compuesto dMePpIX

Mediante una adaptación al procedimiento reportado¹⁰⁹ se obtuvo el compuesto **dMePpIX**.

Bajo atmósfera de N₂ se añadieron 95 mL de metanol seco en un tubo Schlenk el cual estaba sumergido en un baño frío (-20 °C) y se dejó durante 20 min. Transcurrido este tiempo se añadieron 5 mL de H₂SO₄ al 5% y se dejó enfriar durante 20 min. Se añadió 1.0 g (1.648 mmol) de la sal disódica de la protoporfirina IX (**Na₂PpIX**) y se dejó en agitación durante a -20 °C toda la noche en la oscuridad. Transcurrido el tiempo de reacción, se neutralizó con una disolución acuosa al 10% de NaHCO₃, se extrajo la fase orgánica con 50 mL de CHCl₃, La fase orgánica se adicionó a 30 mL de una disolución acuosa de NaCl, se separaron las fases y finalmente la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄. El disolvente se concentró al vacío y el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice usando como fase móvil ActOEt - CH₂Cl₂ (1/9) para dar finalmente 954 mg de

un sólido de color morado con un rendimiento del 98%. La pureza observada mediante HPLC es >99%. MS-FAB⁺ *m/z* (%ar) 591 (30) [M+H]⁺. IR (ATR, cm⁻¹): ν-NH 3039, ν_{as}-CH₃ 2913, ν_s-CH₃ 2852, ν-C=O (éster) 1731. UV-Vis en DMSO [1×10⁻⁵ M], λ_{max} nm, (log ε): λ₁ (Soret) 406 (4.48), λ₂ (Q_{IV}) 506 (4.43), λ₃ (Q_{III}) 540 (3.33), λ₄ (Q_{II}) 576 (3.12), λ₅ (Q_I) 630 (2.97). ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): -3.84 (s, 2H, NH); 3.27 (t, 4H, ³J = 7.75, H-22 y H-25); 3.59, 3.60, 3.67 y 3.68 (4s, 18 H, H-17, H-18, H-19, H-20, O-CH₃ y O-CH₃); 4.38 (t, 4H, ³J = 7.71, H-21 and H-24); 6.18 (dd, 2H, J_{AB} = 1.06, J_{AX} = 11.57, H_A); 6.36 (dd, 2H, J_{BA} = 1.05 Hz, J_{BX} = 17.74 Hz, H_B); 8.25 (m, 2H, H_X); 9.97, 10, 10.11 and 10.13 (4s, 4H, H-α, H-β, H-γ and H-δ). ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): 11.81, 12.84, 21.96, 37.06, 51.89, 96.19, 97.18, 97.50, 98.10, 120.90, 130.42, 173.73. Los átomos fueron enumerados de acuerdo con la **Figura 25**.

7.4.2 Síntesis del compuesto dBnPpIX

La reacción de esterificación se preparó por adaptación de un procedimiento reportado.¹⁰⁹ Bajo atmósfera de N₂ se añadieron 2.0 mL de alcohol bencílico en un tubo Schlenk que se sumergió en un baño frío (-20 °C) y se dejó durante 1 h. Se añadieron 0.5 mL de HCl al 5% y se dejó enfriar durante 20 min, después se añadieron 70 mg (0.115 mmol) de **Na₂PpIX** y se dejó en agitación a -20 °C durante toda la noche en la oscuridad. Transcurrido el tiempo de reacción se neutralizó con una solución acuosa al 10% de NaHCO₃, se extrajo la fase orgánica con 50 mL de CHCl₃ y se separaron las fases y finalmente la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄. El disolvente se concentró al vacío. Se adicionó 30 g hielo triturado para precipitar el producto y finalmente se realizaron lavados con agua para eliminar las trazas de alcohol bencílico. Se filtró al vacío y el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice usando ActOEt – *n*-hexano (6/4) como fase móvil para dar finalmente 76 mg de un sólido de color morado con un rendimiento del 89%. La pureza observada mediante HPLC es >99%. MS-FAB⁺ *m/z* (%ar) 743 (15) [M+H]⁺. IR (ATR, cm⁻¹): ν-NH 3306, ν_{as}-CH₃ 2909, ν_s-CH₃ 2854, ν-C=O (éster) 1735. UV-Vis en DMSO [1×10⁻⁵ M], λ_{max} nm, (log ε): λ₁ (Soret) 408 (4.76), λ₂ (Q_{IV}) 506 (3.87), λ₃ (Q_{III}) 540 (3.77), λ₄ (Q_{II}) 576 (3.56), λ₅ (Q_I) 630 (3.41). ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): -3.87 (s, 2H, NH); 3.30 (t, 4H, ³J = 7.55, H-22 y H-25); 3.55 y 3.67 (2s, 12 H, H-17, H-18, H-19 y H-20); 4.38 (t, 4H, ³J = 7.51, H-21 y H-24); 5.04 (s, 4H, Ph-CH₂); 6.18 (dd, 2H, J_{AB} = 1.01, J_{AX} = 11.56, H_A); 6.37 (dd, 2H, J_{BA} = 1.68, J_{BX} = 17.80, H_B); 7.03 (m, 10H, Ph-H); 8.25 (dd, 2H, J_{XA} = 11.44, J_{XB} = 17.17, H_X); 9.96, 9.97, 10.07 y 10.13 (4s, 4H, H-α, H-β, H-γ y H-δ). ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): 11.83, 12.87, 21.94, 37.18, 66.51, 96.37, 97.25, 97.56, 98.11, 120.93, 128.07, 128.14, 128.41, 130.44, 135.84, 173.14. Los átomos fueron enumerados de acuerdo con la **Figura 25**.

7.4.3 Síntesis de clorinas

La reacción de Diels-Alder para obtener los compuestos a continuación se llevó a cabo mediante una adaptación al procedimiento descrito.^{173,174} En un tubo Schlenk bajo atmósfera de N₂ se añadieron 100 mg de la porfirina correspondiente (**dMePpIX** o **dBnPpIX**), cloroformo seco (5 mL) y un exceso de dimetil acetilenodicarboxilato (DMAD) 100 eq. La reacción se sometió a reflujo durante 72

h con agitación constante y. La reacción se controló por TLC para verificar el consumo del material de partida. Finalmente, los productos de reacción se purificaron mediante columna flash sobre gel de sílice utilizando una mezcla de acetato de etilo, *n*-hexano y CH₂Cl₂ (0.8/8/1.2) como eluyentes.

dMeCloA: Solido azul oscuro. 19 mg, rendimiento 21%. Pureza observada mediante HPLC es >99%. MS-ESI *m/z* (%ar) 734 (100) [M+H]⁺. IR (ATR, cm⁻¹): ν-NH 3334, ν_{as}-CH₃ 2948, ν_s-CH₃ 2856, ν-C=O (éster) 1721. UV-Vis en DMSO [1×10⁻⁵ M], λ_{max} nm, (log ε): λ₁ (Soret) 406 (4.92), λ₂ (Q_{IV}) 502 (4.05), λ₃ (Q_{III}) 536 (3.94), λ₄ (Q_{II}) 608 (3.60), λ₅ (Q_I) 666 (4.51). ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): -2.63 (s, 2H, NH); 2.11 (s, 3H, H-18); 3.26 (t, 2H, *J* = 7.79, H-25); 3.24 (t, 2H, *J* = 7.85, H-22); 3.37 (s, 3H, H-19); 3.52 (a, 3H, H-20); 3.54 (s, 3H, H-17); 3.60 (dd, 1H, *J* = 1.90, H-28); 3.68 (s, 3H, O-CH₃); 3.69 (s, 3H, O-CH₃); 3.93 (s, 3H, H-31); 4.02 (dd, 1H, *J* = 6.67, H-28); 4.07 (s, 3H, H-32); 4.16 (t, 2H, *J* = 7.61, H-24); 4.36 (t, 2H, *J* = 7.23, H-21); 6.14 (dd, 1H, *J*_{AB} = 1.46, *J*_{AX} = 11.51, H_A); 6.32 (dd, 1H, *J*_{BA} = 1.43, *J*_{BX} = 17.84, H_B); 7.39 (dd, 1H, *J* = 1.97, *J* = 6.61, H-27); 8.11 (dd, 1H, *J*_{XA} = 11.49, *J*_{XB} = 17.79, H_X); 9.13 (s, 1H, H-δ); 9.34 (s, 1H, H-α); 9.74 (s, 1H, H-γ); 9.76 (s, 1H, H-β). ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): 11.54, 11.73, 12.40, 21.71, 21.95, 28.33, 29.95, 36.78, 37.17, 51.82, 51.93, 52.57, 52.73, 54.93, 90.54, 92.44; 99.03, 99.49, 118.39, 121.63, 128.77, 129.76, 129.86, 130.58, 133.19, 133.22, 134.16, 136.26, 137.28, 138.08, 138.26, 140.05, 149.25, 149.35, 150.56, 151.93, 152.22, 162.39, 166.21, 170.28, 173.52, 173.90. Los átomos fueron enumerados de acuerdo con la **Figura 27**.

dMeCloB: Solido café. 61 mg, rendimiento 68%. Pureza observada mediante HPLC es >99%. La pureza observada mediante HPLC es >99%. MS-ESI *m/z* (%ar) 733 (100) [M+H]⁺. IR (ATR, cm⁻¹): ν-NH 3339, ν_{as}-CH₃ 2957, ν_s-CH₃ 2854, ν-C=O (éster) 1717. UV-Vis in DMSO [1×10⁻⁵ M], λ_{max} nm, (log ε): λ₁ (Soret) 404 (5.03), λ₂ (Q_{IV}) 500 (4.07), λ₃ (Q_{III}) 534 (3.93), λ₄ (Q_{II}) 608 (3.62), λ₅ (Q_I) 666 (4.55). ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): -2.48 (s, 2H, NH); 2.11 (s, 3H, H-18); 3.20 (2 t, superpuestos, 4H; H-22 y H-25); 3.42 (s, 3H, H-20); 3.49 (s, 3H, H-17); 3.62 (dd, 1H, *J* = 1.88, *J* = 21.03, H-28); 3.66 (s, 6H, O-CH₃); 3.67 (s, 3H, H-19); 3.91 (s, 3H, H-31); 3.98 (dd, 1H, *J* = 6.68, *J* = 21.07, H-28); 4.01 (s, 3H, H-32); 4.17 (t, 2H, ³*J* = 7.54, H-21); 4.31 (t, 2H, ³*J* = 7.57, H-24); 6.17 (dd, 1H, *J*_{AX} = 11.62, H_A); 6.34 (dd, 1H, *J*_{BX} = 17.78, H_B); 7.39 (dd, 1H, ³*J* = 6.37, H-27); 8.18 (dd, 1H; *J*_{XA} = 11.55, *J*_{XB} = 17.79, H_X); 9.22 (s, 1H; H-α); 9.31 (s, 1H, H-β); 9.66 (s, 1H, H-γ); 9.80 (s, 1H, H-δ). ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): 11.43, 11.80, 12.78, 21.67, 21.98, 28.33, 29.96, 36.74, 37.17, 51.83, 51.92, 52.71, 52.75, 54.82, 90.11, 92.77, 98.25, 100.42, 118.77, 120.87, 128.52, 129.72, 130.77, 131.10, 133.28, 133.32, 134.14, 136.51, 136.90, 138.25, 138.52, 139.75, 149.31, 149.39, 151.03, 151.27, 153.03, 162.31, 166.19, 170.21, 173.50, 173.92. Los átomos fueron enumerados de acuerdo con la **Figura 27**.

dBnCloA: Solido azul oscuro. 7 mg, rendimiento 19%. Pureza observada mediante HPLC es >99%. La pureza observada mediante HPLC es >99%. MS-ESI *m/z* (%ar) 885 (100) [M+H]⁺. IR (ATR, cm⁻¹): ν-NH 3341, ν_{as}-CH₃ 2953, ν_s-CH₃ 2850, ν-C=O (éster) 1718. UV-Vis en DMSO [1×10⁻⁵ M], λ_{max} nm, (log ε): λ₁ (Soret) 406 (5.01), λ₂ (Q_{IV}) 502 (3.97), λ₃ (Q_{III}) 536 (3.87), λ₄ (Q_{II}) 608 (3.60), λ₅ (Q_I) 666 (4.42). ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): -2.58 (s, 2H, NH); 2.11 (s, 3H, H-18); 3.24 (2 t, superpuestos,

4H, H-22 y H-25); 3.37 (s, 3H, H-20); 3.48 (s, 3H, H-19); 3.59 (s, 3H, H-17); 3.67 (dd, 1H, $J = 1.76$, H-28); 3.91 (s, 3H, H-31); 4.00 (dd, 1H, $J = 6.76$, H-28); 4.01 (s, 3H, H-32); 4.20 (t, 2H, $^3J = 7.52$, H-21); 4.35 (t, 2H, $^3J = 7.61$, H-24); 5.04 (s, 4H, Ph-CH₂); 6.17 (dd, 1H, $J_{AB} = 1.15$, $J_{AX} = 11.60$, H_A); 6.37 (dd, 1H, $J_{BA} = 1.46$, $J_{BX} = 17.87$, H_B); 7.06 (m, 10H; Ph-H); 7.41 (dd; 1H, $J = 1.75$, $J = 6.42$, H-27); 8.18 (dd, 1H; $J_{XA} = 11.52$, $J_{XB} = 17.73$, H_X); 9.09 (s, 1H; H- δ); 9.39 (s, 1H, H- α); 9.77 (s, 1H, H- γ); 9.82 (s, 1H, H- β). ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): 11.45, 11.81, 12.79, 21.65, 21.97; 28.32, 29.97, 36.88, 37.30, 52.72, 52.76, 54.82, 66.43; 66.55, 90.15, 92.74, 98.42, 100.47, 118.73, 120.86, 124.95, 128.05, 128.53, 129.75, 130.74, 131.18, 133.25, 133.31, 134.19, 136.23, 136.88, 138.25, 138.62, 139.74, 149.34, 149.41, 151.05, 151.36, 153.00, 162.28, 166.21, 170.23, 172.94, 173.35. Los átomos fueron enumerados de acuerdo con la **Figura 27**.

dBnCloB: Sólido café. 17 mg, rendimiento 44%. Pureza observada mediante HPLC es >99%. MS-ESI m/z (%ar) 885 (100) [M+H]⁺. IR (ATR, cm⁻¹): ν -NH 3341, ν_{as} -CH₃ 2923, ν_s -CH₃ 2852, ν -C=O (éster) 1719. UV-Vis en DMSO [1×10^{-5} M], λ_{max} nm, (log ϵ): λ_1 (Soret) 406 (4.99), λ_2 (Q_{IV}) 502 (4.10), λ_3 (Q_{III}) 534 (3.94), λ_4 (Q_{II}) 608 (3.60), λ_5 (Q_I) 666 (4.59). ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): -2.55 (s, 2H, NH); 2.04 (s, 3H, H-18); 3.15 (2 t, superpuestos, 4H, H-22 y H-25); 3.31 (s, 3H, H-20); 3.37 (s, 3H, H-19); 3.55 (dd, 1H, $J = 1.97$, H-28); 3.59 (s, 3H, H-17); 3.82 (s, 3H, H-31); 3.90 (dd, 1H, $J = 6.66$, $J = 22.15$, H-28); 3.94 (s, 3H, H-32); 4.11 (t, 2H, $^3J = 7.52$, H-21); 4.24 (t, 2H, $^3J = 7.61$, H-24); 4.94 (s, 2H, Ph-CH₂); 4.97 (s, 2H, Ph-CH₂); 6.10 (dd, 1H, $J_{AB} = 1.43$, $J_{AX} = 11.54$, H_A); 6.26 (dd, 1H, $J_{BA} = 1.43$, $J_{BX} = 17.88$, H_B); 6.95-7.07 (m, 10H, Ph-H); 7.31 (dd; 1H, $J = 2.01$, $J = 6.68$, H-27); 8.11 (dd, 1H; $J_{XA} = 11.57$, $J_{XB} = 17.84$, H_X); 9.15 (s, 1H, H- α); 9.21 (s, 1H, H- β); 9.60 (s, 1H, H- γ); 9.71 (s, 1H, H- δ). ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): 11.45, 11.81, 12.79, 21.65, 21.97, 28.32, 29.97, 36.88, 37.30, 52.72, 52.76, 54.82, 66.43, 66.55, 90.15, 92.74, 98.42, 100.47, 118.73, 120.86, 124.95, 128.05, 128.53, 129.75, 130.74, 131.18, 133.25, 133.31, 134.19, 136.23, 136.88, 138.25, 138.62, 139.74, 149.34, 149.41, 151.05, 151.36, 153.00, 162.28, 166.21, 170.23, 172.94, 173.35. Los átomos fueron enumerados de acuerdo con la **Figura 27**.

7.5 Síntesis de complejos de rutenio

Los complejos de rutenio se prepararon adaptando un procedimiento descrito.¹¹⁴ Se añadieron 1.0 eq. del ligante correspondiente y 1.1 eq. del precursor [Ru₃(CO)₁₂] a un matraz Schlenk bajo atmósfera de nitrógeno en 10 mL de benceno anhidro. La mezcla se sometió a reflujo bajo agitación constante durante 24 h en la oscuridad. Transcurrido el tiempo de reacción, el disolvente se eliminó al vacío y el sólido obtenido se purificó por una columna cromatográfica de alúmina neutra utilizando una mezcla de *n*-hexano/acetona (1:2) como fase móvil. Se obtuvieron un sólido rosado (utilizando derivados de porfirina como ligantes) o un sólido verde (utilizando derivados de clorina como ligantes).

Cabe mencionar que todos los complejos de rutenio se prepararon bajo las mismas condiciones.

[Ru(dMePpIX)CO]: Se obtuvieron 28 mg (78%) un sólido rosado a partir de 30 mg (0.051 mmol) de **dMePpIX** y 36 mg (0.056 mmol) de **[Ru₃(CO)₁₂]**. Pureza observada mediante HPLC es >99%. MS-FAB⁺ *m/z* (%ar) 718 (22) M⁺. IR (ATR, cm⁻¹): ν_{as}-CH₃ 2921, ν_s-CH₃ 2858, ν-Ru-C=O 1914, ν-C=O (éster) 1744. UV-Vis in DMSO [1×10⁻⁵ M], λ_{max} nm, (log ε): λ₁ (Soret) 404 (4.76), λ₂ (Q_β) 524 (4.08), λ₃ (Q_α) 558 (4.27). ¹H RMN (CD₃CN, 500 MHz): 3.30 (t, 4H, H-22 y H-25); 3.57, 3.59, 3.60, 3.61, 3.70 y 3.71 (6s, 18H, H-17, H-18, H-19, H-20, O-CH₃ y O-CH₃); 4.33 (t, 4H, H-21 y H-24); 6.11 (dd, 2H, J_{AB} = 1.52, J_{AX} = 11.51, H_A); 6.40 (dd, 2H, J_{BA} = 1.49, J_{BX} = 17.82, H_B); 8.38 (m, 2H, J_{XA} = 11.47, J_{XB} = 17.85, H_X); 9.94, 10.06, 10.10, 10.17 (4s, 4H, H-α, H-β, H-γ y H-δ). ¹³C RMN (CD₃CN, 125 MHz): 11.72, 12.94, 14.32, 22.38, 23.29, 30.83, 32.26, 37.56, 52.06, 99.34, 100.01, 100.21, 100.67, 119.87, 174.46, 207.46 (Ru-CO). Los átomos fueron enumerados de acuerdo con la **Figura 41**.

[Ru(dBnPpIX)CO]: Se obtuvo 21 mg (61%) de un sólido rosa a partir de 30 mg (0.041 mmol) de **dBnPpIX** y 28 mg (0.044 mmol) de **[Ru₃(CO)₁₂]**. Pureza observada mediante HPLC es >99%. MS-ESI *m/z* (%ar) 872 (100) [M+H]⁺. IR (ATR, cm⁻¹): ν_{as}-CH₃ 2922, ν_s-CH₃ 2859, ν-Ru-C=O 1915, ν-C=O (éster) 1729. UV-Vis in DMSO [1×10⁻⁵ M], λ_{max} nm, (log ε): λ₁ (Soret) 402 (4.76), λ₂ (Q_β) 524 (4.08), λ₃ (Q_α) 558 (4.11). ¹H RMN (CD₃CN, 500 MHz): 3.36 (t, 4H, H-22 y H-25); 3.52, 3.55, 3.70 y 3.71 (4s, 12H, H-17, H-18, H-19 y H-20); 4.34 (t, 4H, H-21 y H-24); 5.05 (s, 4H, Ph-CH₂); 6.11 (dd, 2H, J_{AB} = 1.72, J_{AX} = 11.54, H_A); 6.40 (dd, 2H, J_{BA} = 1.78, J_{BX} = 17.89, H_B); 7.13 (m, 10H, Ph-H); 8.40 (dd, 2H, J_{XA} = 11.75, J_{XB} = 17.58, H_X); 9.98, 10.04, 10.08 y 10.17 (4s, 4H, H-α, H-β, H-γ y H-δ). ¹³C RMN (CD₃CN, 125 MHz): 11.58, 11.79, 18.07, 20.26, 22.52, 29.70, 37.87, 37.93, 66.78, 99.18, 99.36, 99.39, 99.52, 128.58, 128.70, 128.79, 129.29, 129.32, 131.42, 136.81, 136.91, 137.47, 138.04, 138.06, 140.02, 140.05, 142.01, 142.34, 142.57, 143.02, 143.05, 143.31, 143.36, 143.91, 144.02, 174.01, 211.04 (Ru-CO). Los átomos fueron enumerados de acuerdo con la **Figura 41**.

[Ru(dMeCloA)CO]: A partir de 30 mg (0.041 mmol) de **dMeCloA** y 29 mg (0.045 mmol) de **[Ru₃(CO)₁₂]** se obtuvo 4 mg (13%) de un sólido verde. Pureza observada mediante HPLC es >98%. MS-ESI *m/z* (%ar) 863 (100) [M+H]⁺. IR (ATR, cm⁻¹): ν_{as}-CH₃ 2992, ν_s-CH₃ 2854, ν-Ru-C=O 1927, ν-C=O (éster) 1722. UV-Vis en DMSO [1×10⁻⁵ M], λ_{max} nm, (log ε): λ₁ (Soret) 406 (4.83), λ₂ (Q_β) 536 (3.81), λ₃ (Q_α) 568 (3.94), λ₄ (Q_γ) 606 (4.24). ¹H RMN (acetona-*d*₆, 300 MHz): 2.83 (s, 3H, H-18); 3.14 (t, 2H, H-22); 3.26 (t, 2H, H-25); 3.31 (s, 3H, H-19); 3.55 (s, 3H, H-20); 3.56 (s, 3H, H-17); 3.57 (dd, 1H, J = 2.39, H-28); 3.61 (s, 3H, O-CH₃); 3.62 (s, 3H, O-CH₃); 3.66 (dd, 1H, J = 7.59, H-28); 3.90 (s, 3H, H-31); 4.08 (s, 3H, H-32); 4.11 (t, 2H, H-24); 4.37 (t, 2H, H-21); 6.14 (dd, 1H, J_{AB} = 1.58, J_{AX} = 11.62, H_A); 6.37 (dd, 1H, J_{BA} = 1.63, J_{BX} = 17.91, H_B); 7.65 (dd, 1H, J = 2.30, H-27); 8.23 (dd, 1H, J_{XA} = 11.67, J_{XB} = 17.88, H_X); 9.20 (s, 1H, H-δ); 9.55 (s, 1H, H-α); 9.77 (s, 1H, H-γ); 9.91 (s, 1H, H-β). ¹³C RMN (acetona-*d*₆, 75 MHz): 11.43, 11.50, 12.35, 21.97, 22.17, 37.04, 37.47, 51.69, 51.80, 52.00, 52.79, 91.49, 93.15, 99.95, 100.39, 120.57, 121.95, 127.14, 130.47, 137.91, 141.39, 143.33, 149.10, 149.49, 151.67, 152.00, 152.75, 163.53, 166.63, 173.68, 173.87. Los átomos fueron enumerados de acuerdo con la **Figura 41**.

[Ru(dMeCloB)CO]: Se obtuvo 6 mg (16%) un sólido verde a partir de 30 mg (0.041 mmol) de **dMeCloB** y 29 mg (0.045 mmol) de **[Ru₃(CO)₁₂]**. Pureza observada mediante HPLC es >98%. MS-ESI *m/z* (%ar) 862 (100) [M+H]⁺. IR (ATR, cm⁻¹): ν_{as}-CH₃ 2923, ν_s-CH₃ 2857, ν-Ru-C=O 1923, ν-C=O (éster) 1721. UV-Vis en DMSO [1×10^{-5} M], λ_{max} nm, (log ε): λ₁ (Soret) 406 (4.63), λ₂ (Q_β) 534 (3.66), λ₃ (Q_α) 568 (3.83), λ₄ (Q_γ) 606 (4.02). ¹H RMN (acetona-*d*₆, 300 MHz): 2.79 (s, 3H, H-18); 3.17 (t, 2H, H-22); 3.25 (t, 2H, H-25); 3.42 (s, 3H, H-20); 3.54 (s, 3H, H-17); 3.60 (s, 3H, O-CH₃); 3.61 (s, 3H, O-CH₃); 3.68 (s, 3H, H-19); 3.76 (d, 1H, H-28) 3.88 (s, 3H, H-31); 4.00 (d, 1H, H-28); 4.03 (s, 3H, H-32); 4.16 (t, 2H); 4.34 (t, 2H); 6.21 (dd, 1H, J_{AB} = 1.447, J_{AX} = 11.586, H_A); 6.39 (dd, 1H, J_{BA} = 1.466, J_{BX} = 17.892, H_B); 7.68 (dd, 1H, ³J = 6.775, H-27); 8.21 (dd, 1H; J_{XA} = 11.603, J_{XB} = 17.852, H_X); 9.31 (s, 1H, H-α); 9.55 (s, 1H, H-β); 9.87 (s, 1H, H-γ); 9.95 (s, 1H, H-δ). ¹³C RMN (acetona-*d*₆, 75 MHz): 11.15, 11.49, 12.52, 21.84, 22.14, 36.92, 37.42, 51.69, 51.78, 52.79, 52.92, 55.07, 90.98, 93.37, 99.35, 101.34, 120.89, 121.36, 130.02, 130.36, 137.01, 137.92, 139.05, 139.39, 149.55, 151.84, 152.45, 154.25, 163.23, 166.61, 170.32, 173.63, 173.88. Los átomos fueron enumerados de acuerdo con la **Figura 41**.

7.6 Cristalografía

Se logró obtener monocristales adecuados para estudios por difracción de rayos X de los compuestos **dMeCloB**, **[Ru(dMePpIX)CO]** y **[Ru(dBnPpIX)CO]** mediante la técnica evaporación lenta en una disolución de diclorometano/hexano. Los datos de los compuestos se recolectaron a temperatura ambiente (298 K) en un difractómetro CCD Bruker Apex-II utilizando radiación monocromática de grafito MoKα (0,71073 Å). La determinación de la celda y los parámetros finales de la celda se obtuvieron en todas las reflexiones utilizando el software Bruker SAINT incluido en la suite de software APEX2. La integración y el escalado de los datos se realizaron utilizando el software Bruker SAINT.¹⁷⁵

7.7 Estudios por espectrofotometría UV-Vis

Todos los espectros de absorción se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu 2600 en cubetas de cuarzo a temperatura constante de 37 °C con disoluciones 1×10^{-5} M de cada compuesto (Las disoluciones fueron preparadas a partir de una disolución stock al 10 mM en DMSO).

7.8 Estudios de estabilidad

Para determinar la estabilidad de cada compuesto se usaron dos medios. Primero se estudió la estabilidad en DMSO, donde cada hora se realizó una medición durante 24 horas. Como segundo medio se tomaron mediciones cada hora durante 8 horas en una disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (Dominique Dutscher SAS) sin magnesio y sin calcio (PBS) que contenía DMSO al 0.1%.

7.9 Estudios de fotoestabilidad

Se estudió la fotodegradación de todos los compuestos sintetizados como se describe en la literatura.¹⁷⁶ Se preparó una solución de cada compuesto a una

concentración de 1×10^{-5} M en DMSO o PBS/DMSO (0.1%). Cada solución fue irradiada con luz blanca a diferentes periodos de tiempo hasta completar 15 minutos (tiempo de irradiación: 0, 3, 6, 9, 12 y 15 minutos), donde, se registró un espectro de absorción a una temperatura constante de 37 °C.

7.10 Estudios de lipofilicidad

La lipofilicidad de cada compuesto se determinó experimentalmente con el coeficiente de partición ($\log P_{O/PBS}$) a temperatura ambiente siguiendo el método descrito.^{129,177} Se mezclaron 1-octanol y PBS en cantidades iguales (1 mL) y se agitaron durante 24 h. Una vez terminada las 24 h se dejó que las fases se separaran durante 24 h. Se preparó una disolución 1×10^{-5} M de cada compuesto en 1-octanol/PBS (1:1) y se dejó que la mezcla se agitara durante 24 h. Por último, se determinó la concentración de cada compuesto en las dos fases mediante espectrofotometría UV-Vis a 37 °C. El $\log P_{O/PBS}$ se determinó mediante la siguiente ecuación.¹⁷⁸

$$\log P = \log\left(\frac{A_{ap}}{A_{bp} - A_{ap}}\right)$$

Donde A_{ap} es la absorbancia del compuesto después de la partición y A_{bp} es la absorbancia del compuesto antes de la partición.

7.11 Evaluación del rendimiento cuántico de fluorescencia

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia se determinaron en DMSO utilizando verteporfina como referencia ($\Phi_f = 0.0085$).^{142,176} Los ligantes se excitaron a una longitud de onda de 503 nm y 573 nm para los complejos de rutenio y el rendimiento cuántico se calculó mediante la siguiente ecuación.^{179,180}

$$\Phi_f = \Phi_{ST} \left(\frac{Grad_x}{Grad_{ST}} \right) \left(\frac{\eta_x^2}{\eta_{ST}^2} \right)$$

Donde ST y X corresponden al estándar y al analito respectivamente, Φ_f es el rendimiento cuántico de fluorescencia, Grad es el gradiente del área de integración de la intensidad de fluorescencia de la referencia vs el área de integración de la absorbancia del analito y η es el índice de refracción del disolvente utilizado.

7.12 Evaluación del rendimiento cuántico de oxígeno singulete

El rendimiento cuántico de formación del oxígeno singulete (1O_2) se determinó en DMSO (equilibrado con oxígeno) y luz blanca, utilizando 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) como trampa química y $[Ru(bpy)_3](PF_6)_2$ y verteporfina como referencias.¹⁸¹ Para este experimento se monitoreó la banda de absorción del DPBF a 274 nm, que decae en presencia de oxígeno singulete.¹⁸²

El rendimiento cuántico de 1O_2 se determinó mediante la siguiente ecuación:^{144,183}

$$\Phi_{\Delta PS} = \Phi_{\Delta ref} \frac{k_{PS}}{k_{ref}}$$

Donde PS es el fotosensibilizador, $\Phi_{\Delta ref}$ es el rendimiento cuántico de formación de oxígeno singulete de la referencia en DMSO, k representa la pendiente de las muestras y la referencia calculada mediante el cambio de absorbancia del DPBF en los máximos de absorbancia con respecto al tiempo de irradiación.

7.13 Determinación de las especies reactivas de oxígeno mediante EPR

7.13.1 Detección del oxígeno singulete

La detección de $^1\text{O}_2$ se basa en la reacción específica entre $^3\text{O}_2$ y 2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMP) que produce el radical estable (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il)óxido (TEMPO). La detección de $^1\text{O}_2$ se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente procedimiento. Se preparó una disolución de cada compuesto a una concentración de 1×10^{-3} M junto con TEMP a 0.06 M en una disolución de etanol/DMSO (1%) equilibrada con aire a temperatura ambiente. Posteriormente se irradió la muestra en una celda plana durante un máximo de 15 min con luz blanca, produciendo una señal en forma de triplete correspondiente al aducto TEMPO el cual indica la fotoproducción de la especie $^1\text{O}_2$. Los espectros de EPR se obtuvieron con los siguientes parámetros: campo central, 334.5 ± 4 mT; potencia, 1.0 mW; frecuencia de microondas, 9.43 GHz; anchura de modulación, 0.5 mT; constante de tiempo, 0.1 s; amplitud, 10.

7.13.2 Detección del radical superóxido

Se utilizó 5,5-dimetil-1-pirrolina-*N*-óxido (DMPO, de Dojindo Japón) para la detección del radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Los espectros EPR se realizaron de acuerdo con el siguiente procedimiento. DMPO a 0.07 M en metanol/DMSO (1%) y cada compuesto a 1×10^{-3} M, la disolución final se irradió una celda plana durante un máximo de 15 min con luz blanca, produciendo una señal correspondiente al aducto DMPO- $\text{O}_2^{\cdot-}$ que indica la fotoproducción de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Los espectros EPR se obtuvieron con los siguientes parámetros: campo central, 335 ± 4 mT; potencia, 8.0 mW; frecuencia de microondas, 9.43 GHz; anchura de modulación, 0.63 mT; constante de tiempo, 0.1 s; amplitud, 100.

7.14 Línea Celular

La línea celular de adenocarcinoma gástrico humano (AGS) se adquirió a ATCC® (Manassa, VA). Las células AGS se cultivaron en medio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) con un 10% de suero bovino fetal (FBS) a 37 °C en una atmósfera humidificada de 95% de aire y 5% de CO_2 .

7.15 Determinación de la citotoxicidad

La actividad antiproliferativa en las células cancerosas se determinó mediante el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Se sembraron 10.000 células por pocillo (200 μ L) en placas Cellstar® de 96 pocillos (Greiner Bio-One) y se incubaron durante 24 h. A continuación, se trataron las células con cada compuesto a diferentes concentraciones durante 8 h. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio, se añadió medio fresco y se irradiaron o no las células con luz blanca durante 15 min. Posteriormente, las placas se incubaron durante 48 h. Por último, se realizó el ensayo MTT como se describe la literatura.¹⁸⁴ La inhibición de la viabilidad celular se evaluó con referencia al valor de IC₅₀ obtenido a partir de las curvas de dosis-respuesta (viabilidad celular) frente a las diferentes concentraciones usadas de cada compuesto. Las mediciones se realizaron a 550 nm con el lector multimodo Tristar2 (Berthold Technologies).

7.16 Ensayos de Western blot

Las células AGS se trataron con los compuestos seleccionados a la IC₅₀ durante 24 horas a 37 °C y se irradiaron o no con luz blanca durante 15 minutos. A continuación, las células se lisaron en tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 6.7, NaCl 150 mM, NP40 1%,). Se determinó la concentración total de proteínas mediante el ensayo de Bradford y se ajustó a la misma cantidad (50 μ g) para cada experimento para luego, ser separadas mediante SDS-PAGE al 6% - 15% (dependiendo del peso molecular de la proteína) y se transfirieron a membranas de Nitrocelulosa Blotting. Las membranas se bloquearon con tampón de bloqueo (que contenía un 5% de leche en polvo o un 1% de BSA) durante 1 h. a temperatura ambiente, después se lavaron tres veces con TBST o PBST (que contenía un 0.1% de Tween-20) y se incubaron con anticuerpos primarios a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, las membranas se lavaron de nuevo tres veces con PBST o PBST. A continuación, se incubaron con anticuerpos (anti-rabbit o anti-mouse) durante 1 hora a temperatura ambiente y se visualizaron mediante quimioluminiscencia mejorada utilizando Clarity™ ECL Western blotting Substrate Bio-Rad de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las señales se adquirieron con la ayuda de Immobilon Crescendo u Ozyme en equipos Syngene PXi utilizando el software GeneSys. Las bandas de proteínas se cuantificaron utilizando el software ImageJ.¹⁸⁵ Se realizaron Western blots utilizando los siguientes anticuerpos: GAPDH (6C5) (1:2000, sc-32233, Santa Cruz Blotechnology); PARP escindida (D64E10) (1:1000, 5625S, Cell Signaling Technology); COX2 (D5H5) (1:1000, 12282S, Cell Signaling Technology); CHOP/GADD 153 (B-3) (1: 500, sc-7351, Santa Cruz Blotechnology); Cleaved Caspase-3 (D175) (1:1000, 9661L, Cell Signaling Technology); GPX4 (1:1000, ab25066, abcan) y LC3B (D11) (1:1000, 3868S, Cell Signaling Technology). Los anticuerpos secundarios fueron: Anti-rabbit IgG (1:10000, 7074S, Cell Signaling Technology) y Anti-mouse IgG (1:8000, 7076S, Cell Signaling Technology). La carga proteica se controló con gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) para la normalización.

8. Referencias

- (1) Cuadrado, C. F.; Lagos, K. J.; Stringasci, M. D.; Bagnato, V. S.; Romero, M. P. Clinical and Pre-Clinical Advances in the PDT/PTT Strategy for Diagnosis and Treatment of Cancer. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2024**, *50*, 104387. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2024.104387>.
- (2) *Cancer*. <https://www-who-int.pbidi.unam.mx:2443/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed 2025-03-27).
- (3) <https://www.elmundo.es/elmundosalud/especiales/cancer/basicos1.html>.
<https://www.elmundo.es/elmundosalud/especiales/cancer/basicos1.html> (accessed 2025-03-27).
- (4) Upadhyay, A.; Kundu, P.; Ramu, V.; Kondaiah, P.; Chakravarty, A. R. BODIPY-Tagged Platinum(II) Curcumin Complexes for Endoplasmic Reticulum-Targeted Red Light PDT. *Inorg. Chem.* **2022**, *61* (3), 1335–1348. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.1c02745>.
- (5) Florea, A.-M.; Büsselberg, D. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers* **2011**, *3* (1), 1351–1371. <https://doi.org/10.3390/cancers3011351>.
- (6) Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; Hamblin, M. R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Mroz, P.; Nowis, D.; Piette, J.; Wilson, B. C.; Golab, J. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA. Cancer J. Clin.* **2011**, *61* (4), 250–281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>.
- (7) Juarranz, Á.; Jaén, P.; Sanz-Rodríguez, F.; Cuevas, J.; González, S. Photodynamic Therapy of Cancer. Basic Principles and Applications. *Clin. Transl. Oncol.* **2008**, *10* (3), 148–154. <https://doi.org/10.1007/s12094-008-0172-2>.
- (8) Calixto, G. M. F.; Bernegossi, J.; De Freitas, L. M.; Fontana, C. R.; Chorilli, M. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. *Molecules* **2016**, *21* (3), 342. <https://doi.org/10.3390/molecules21030342>.
- (9) O'Connor, A. E.; Gallagher, W. M.; Byrne, A. T. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.* **2009**, *85* (5), 1053–1074. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00585.x>.
- (10) Kharkwal, G. B.; Sharma, S. K.; Huang, Y.-Y.; Dai, T.; Hamblin, M. R. Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. *Lasers Surg. Med.* **2011**, *43* (7), 755–767. <https://doi.org/10.1002/lsm.21080>.
- (11) Mishchenko, T.; Balalaeva, I.; Gorokhova, A.; Vedunova, M.; Krysko, D. V. Which Cell Death Modality Wins the Contest for Photodynamic Therapy of Cancer? *Cell Death Dis.* **2022**, *13* (5), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04851-4>.
- (12) *Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms*. <https://e-ce.org/journal/view.php?doi=10.5946/ce.2013.46.1.24> (accessed 2025-03-27).
- (13) Chen, F.; Lv, X.; Kuzuhara, D.; Zhang, T.; Pan, J.; Qiu, F.; Teranishi, T.; Xue, S. Effect of Peripheral Functionalization of Pt(II) Porphyrin(2.1.2.1) on Singlet

- Oxygen Generation. *Inorg. Chem.* **2024**, 63 (44), 21025–21030. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.4c02924>.
- (14) Mahalingam, S. M.; Arumugam, N.; Shing Wong, L.; Cordelia Tanislaus Antony Dhanapal, A.; Djearmane, S. Mechanistic Investigation of Photodynamic Therapy Using Visudyne in Human KB Carcinoma Cells. *J. King Saud Univ. - Sci.* **2023**, 35 (8), 102871. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2023.102871>.
 - (15) Xue, Q.; Zhang, J.; Jiao, J.; Qin, W.; Yang, X. Photodynamic Therapy for Prostate Cancer: Recent Advances, Challenges and Opportunities. *Front. Oncol.* **2022**, 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.980239>.
 - (16) Monro, S.; Colón, K. L.; Yin, H.; Roque, J. I.; Konda, P.; Gujar, S.; Thummel, R. P.; Lilge, L.; Cameron, C. G.; McFarland, S. A. Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433. *Chem. Rev.* **2019**, 119 (2), 797–828. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00211>.
 - (17) *Crece la carga mundial de cáncer en medio de una creciente necesidad de servicios.* <https://www.who.int/es/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services> (accessed 2025-03-27).
 - (18) Estadísticas de Defunciones Registradas (EDR) de enero a junio de 2023 (preliminar). **2024**.
 - (19) Sanitas. *Tumores: síntomas, diagnóstico y tratamiento.* Sanitas. <https://www.sanitas.es/biblioteca-de-salud/enfermedades-y-trastornos/cancer/tipos-tumores> (accessed 2025-03-27).
 - (20) *What Is Cancer?* - NCI. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (accessed 2025-03-27).
 - (21) Stubbs, M.; McSheehy, P. M. J.; Griffiths, J. R.; Bashford, C. L. Causes and Consequences of Tumour Acidity and Implications for Treatment. *Mol. Med. Today* **2000**, 6 (1), 15–19. [https://doi.org/10.1016/S1357-4310\(99\)01615-9](https://doi.org/10.1016/S1357-4310(99)01615-9).
 - (22) Willers, I. M.; Cuezva, J. M. Post-Transcriptional Regulation of the Mitochondrial H⁺-ATP Synthase: A Key Regulator of the Metabolic Phenotype in Cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2011**, 1807 (6), 543–551. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.10.016>.
 - (23) *Fases del cáncer.* Asociación Española Contra el Cáncer. <https://www.contraelcancer.es/es/todo-sobre-cancer/que-es-cancer/fases> (accessed 2025-03-27).
 - (24) *Types of Cancer Treatments.* WebMD. <https://www.webmd.com/cancer/ss/slideshow-cancer-treatments> (accessed 2025-03-27).
 - (25) *Cirugía para el cáncer.* <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/cirugia> (accessed 2025-03-27).
 - (26) *Radioterapia para el cáncer.* <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/radioterapia> (accessed 2025-03-27).
 - (27) *Inmunoterapia.* <https://www.cancer.org/es/cancer/como-sobrellevar-el-cancer/tipos-de-tratamiento/inmunoterapia.html> (accessed 2025-03-27).

- (28) *Inhibidores de puntos de control inmunitario*. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia/inhibidores-de-puntos-de-control> (accessed 2025-03-27).
- (29) *Vacunas contra el cáncer*. Cancer Research Institute. <https://www.cancerresearch.org/es/treatment-types/cancer-vaccines> (accessed 2025-03-27).
- (30) *Anticuerpos monoclonales*. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia/anticuerpos-monoclonales> (accessed 2025-03-27).
- (31) *Terapia dirigida*. <https://www.cancer.org/es/cancer/como-sobrellevar-el-cancer/tipos-de-tratamiento/terapia-dirigida.html> (accessed 2025-03-27).
- (32) *Trasplante de células madre o médula ósea*. <https://www.cancer.org/es/cancer/como-sobrellevar-el-cancer/tipos-de-tratamiento/trasplante-de-celulas-madre.html> (accessed 2025-03-27).
- (33) *Terapia hormonal para el cáncer*. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/terapia-hormonal> (accessed 2025-03-28).
- (34) *Quimioterapia para tratar el cáncer*. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/quimioterapia> (accessed 2025-03-28).
- (35) Dehghanpour, S.; Pourzamani, H. R.; Amin, M. M.; Ebrahimpour, K. Evaluation of Toxic Effects of Platinum-Based Antineoplastic Drugs (Cisplatin, Carboplatin and Oxaliplatin) on Green Alga *Chlorella Vulgaris*. *Aquat. Toxicol.* **2020**, *223*, 105495. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105495>.
- (36) Peyrone, M. Ueber Die Einwirkung Des Ammoniaks Auf Platinchlorür. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1844**, *51* (1), 1–29. <https://doi.org/10.1002/jlac.18440510102>.
- (37) Werner, A. Beitrag Zur Konstitution Anorganischer Verbindungen. *Z. Für Anorg. Chem.* **1893**, *3* (1), 267–330. <https://doi.org/10.1002/zaac.18930030136>.
- (38) Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* **1965**, *205* (4972), 698–699. <https://doi.org/10.1038/205698a0>.
- (39) Rosenberg, B.; Vancamp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, V. H. Platinum Compounds: A New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature* **1969**, *222* (5191), 385–386. <https://doi.org/10.1038/222385a0>.
- (40) Oun, R.; Moussa, Y. E.; Wheate, N. J. The Side Effects of Platinum-Based Chemotherapy Drugs: A Review for Chemists. *Dalton Trans.* **2018**, *47* (19), 6645–6653. <https://doi.org/10.1039/C8DT00838H>.
- (41) *Definición de oxaliplatino - Diccionario de cáncer del NCI - NCI*. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/oxaliplatino> (accessed 2025-03-28).
- (42) *Definición de carboplatino - Diccionario de cáncer del NCI - NCI*. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/carboplatino> (accessed 2025-03-28).
- (43) Brown, S. D.; Nativo, P.; Smith, J.-A.; Stirling, D.; Edwards, P. R.; Venugopal, B.; Flint, D. J.; Plumb, J. A.; Graham, D.; Wheate, N. J. Gold

- Nanoparticles for the Improved Anticancer Drug Delivery of the Active Component of Oxaliplatin. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132 (13), 4678–4684. <https://doi.org/10.1021/ja908117a>.
- (44) Lebwohl, D.; Canetta, R. Clinical Development of Platinum Complexes in Cancer Therapy: An Historical Perspective and an Update. *Eur. J. Cancer* **1998**, 34 (10), 1522–1534. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(98\)00224-X](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(98)00224-X).
- (45) Johnstone, T. C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S. J. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chem. Rev.* **2016**, 116 (5), 3436–3486. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00597>.
- (46) Johnstone, T. C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S. J. Third Row Transition Metals for the Treatment of Cancer. *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* **2015**. <https://doi.org/10.1098/rsta.2014.0185>.
- (47) Todd, R. C.; Lippard, S. J. Inhibition of Transcription by Platinum Antitumor Compounds. *Metallomics* **2009**, 1 (4), 280–291. <https://doi.org/10.1039/B907567D>.
- (48) Hamblin, M. R. Photodynamic Therapy for Cancer: What's Past Is Prologue. *Photochem. Photobiol.* **2020**, 96 (3), 506–516. <https://doi.org/10.1111/php.13190>.
- (49) *La terapia fotodinámica promete revolucionar el tratamiento del cáncer: Photodynamic Therapy Promises to Revolutionize Cancer Treatment | TECNOCENCIA Chihuahua.* <https://revistascientificas.uach.mx/index.php/tecnociencia/article/view/1355> (accessed 2025-03-28).
- (50) Copeman, S. M. Activated (irradiated) fluorescein in the treatment of cancer. *Br. Med. J.* **1931**, 1 (3667), 658–660. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.3667.658>.
- (51) Hermann Tappeiner, A. J. *Die sensibilisierende Wirkung fluorescierender Substanzen: Gesammelte*; Vogel, 1907.
- (52) Zheng, Y.; Li, Z.; Chen, H.; Gao, Y. Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems for Controllable Photodynamic Cancer Therapy. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2020**, 144, 105213. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105213>.
- (53) St. Denis, T. G.; Dai, Tianhong; Izikson, Leonid; Astrakas, Christos; Anderson, Richard Rox; Hamblin, Michael R; and Tegos, G. P. All You Need Is Light: Antimicrobial Photoinactivation as an Evolving and Emerging Discovery Strategy against Infectious Disease. *Virulence* **2011**, 2 (6), 509–520. <https://doi.org/10.4161/viru.2.6.17889>.
- (54) Kushibiki, T.; Hirasawa, T.; Okawa, S.; Ishihara, M. Responses of Cancer Cells Induced by Photodynamic Therapy. *J. Healthc. Eng.* **2013**, 4 (1), 310683. <https://doi.org/10.1260/2040-2295.4.1.87>.
- (55) *Terapia fotodinámica.* <https://www.cancer.org/es/cancer/como-sobrellevar-el-cancer/tipos-de-tratamiento/radioterapia/terapia-fotodinamica.html> (accessed 2025-03-28).
- (56) Shafirstein, G.; Bellnier, D.; Oakley, E.; Hamilton, S.; Potasek, M.; Beeson, K.; Parilov, E. Interstitial Photodynamic Therapy—A Focused Review. *Cancers* **2017**, 9 (2), 12. <https://doi.org/10.3390/cancers9020012>.
- (57) Wen, X.; Li, Y.; Hamblin, M. R. Photodynamic Therapy in Dermatology beyond Non-Melanoma Cancer: An Update. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2017**, 19, 140–152. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.06.010>.

- (58) Xiao, Q.; Wu, J.; Pang, X.; Jiang, Y.; Wang, P.; Leung, A. W.; Gao, L.; Jiang, S.; Xu, C. Discovery and Development of Natural Products and Their Derivatives as Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Curr. Med. Chem.* **25** (7), 839–860. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170823143137>.
- (59) *Hypericin-Based Photodynamic Therapy Displays Higher Selectivity and Phototoxicity towards Melanoma and Squamous Cell Cancer Compared to Normal Keratinocytes In Vitro.* <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/23/16897> (accessed 2025-03-28).
- (60) Insińska-Rak, M.; Sikorski, M.; Wolnicka-Glubisz, A. Riboflavin and Its Derivates as Potential Photosensitizers in the Photodynamic Treatment of Skin Cancers. *Cells* **2023**, *12* (18), 2304. <https://doi.org/10.3390/cells12182304>.
- (61) Mani, A.; Feng, T.; Gandioso, A.; Vinck, R.; Notaro, A.; Gourdon, L.; Burckel, P.; Saubaméa, B.; Blacque, O.; Cariou, K.; Belgaied, J.-E.; Chao, H.; Gasser, G. Structurally Simple Osmium(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers for Photodynamic Therapy in the Near Infrared. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62* (20), e202218347. <https://doi.org/10.1002/anie.202218347>.
- (62) *Novel Osmium-based Coordination Complexes as Photosensitizers for Panchromatic Photodynamic Therapy - Lazic - 2017 - Photochemistry and Photobiology - Wiley Online Library.* <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/php.12767> (accessed 2025-03-28).
- (63) Thota, S.; Rodrigues, D. A.; Crans, D. C.; Barreiro, E. J. Ru(II) Compounds: Next-Generation Anticancer Metallotherapeutics? *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (14), 5805–5821. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01689>.
- (64) Liu, J.; Lai, H.; Xiong, Z.; Chen, B.; Chen, T. Functionalization and Cancer-Targeting Design of Ruthenium Complexes for Precise Cancer Therapy. *Chem. Commun.* **2019**, *55* (67), 9904–9914. <https://doi.org/10.1039/C9CC04098F>.
- (65) Oliveira, G. de F. S.; Gouveia, F. S. Jr.; Andrade, A. L.; de Vasconcelos, M. A.; Teixeira, E. H.; Palmeira-Mello, M. V.; Batista, A. A.; Lopes, L. G. de F.; de Carvalho, I. M. M.; Sousa, E. H. S. Minimal Functionalization of Ruthenium Compounds with Enhanced Photoreactivity against Hard-to-Treat Cancer Cells and Resistant Bacteria. *Inorg. Chem.* **2024**, *63* (31), 14673–14690. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.4c02235>.
- (66) Abrahamse, H.; Hamblin, M. R. New Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Biochem. J.* **2016**, *473* (4), 347–364. <https://doi.org/10.1042/BJ20150942>.
- (67) Min Park, J.; Lee, J. H.; Jang, W.-D. Applications of Porphyrins in Emerging Energy Conversion Technologies. *Coord. Chem. Rev.* **2020**, *407*, 213157. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.213157>.
- (68) Rothmund, P. A New Porphyrin Synthesis. The Synthesis of Porphin1. *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, *58* (4), 625–627. <https://doi.org/10.1021/ja01295a027>.

- (69) Mondal, S.; Pain, T.; Sahu, K.; Kar, S. Large-Scale Green Synthesis of Porphyrins. *ACS Omega* **2021**, 6 (35), 22922–22936. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c03534>.
- (70) Vicente, M. da G. H.; Smith, K. M. Syntheses and Functionalizations of Porphyrin Macrocycles. *Curr. Org. Synth.* **11** (1), 3–28. <https://doi.org/10.2174/15701794113106660083>.
- (71) Fischer, H. *Die Chemie des Pyrrols*; Ann Arbor, MI.: University Microfilms International, 1980.
- (72) *TP introduction*. <https://iupac.qmul.ac.uk/tetrapyrrole/intro.html#pre> (accessed 2025-03-28).
- (73) Bryden, F.; Boyle, R. W. Chapter Four - Metalloporphyrins for Medical Imaging Applications. In *Advances in Inorganic Chemistry*; van Eldik, R., Hubbard, C. D., Eds.; Insights from Imaging in Bioinorganic Chemistry; Academic Press, 2016; Vol. 68, pp 141–221. <https://doi.org/10.1016/bs.adioch.2015.09.003>.
- (74) Lopes, J. M. S.; Costa, S. N.; Batista, A. A.; Dinelli, L. R.; Araujo, P. T.; Neto, N. M. B. Photophysics and Visible Light Photodissociation of Supramolecular Meso-Tetra(4-Pyridyl) Porphyrin/RuCl₂(CO)(PPh₃)₂ Structures. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2020**, 237, 118351. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118351>.
- (75) Arnaut, L. G. Chapter 5 - Design of Porphyrin-Based Photosensitizers for Photodynamic Therapy. In *Advances in Inorganic Chemistry*; Eldik, R. van, Stochel, G., Eds.; Inorganic Photochemistry; Academic Press, 2011; Vol. 63, pp 187–233. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385904-4.00006-8>.
- (76) Dougherty, T. J. Hematoporphyrin as a Photosensitizer of Tumors. *Photochem. Photobiol.* **1983**, 38 (3), 377–379. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1983.tb02687.x>.
- (77) Yano, S.; Hirohara, S.; Obata, M.; Hagiya, Y.; Ogura, S.; Ikeda, A.; Kataoka, H.; Tanaka, M.; Joh, T. Current States and Future Views in Photodynamic Therapy. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **2011**, 12 (1), 46–67. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2011.06.001>.
- (78) Bonnett, R.; White, R. D.; Winfield, U. J.; Berenbaum, M. C. Hydroporphyrins of the Meso-Tetra(Hydroxyphenyl)Porphyrin Series as Tumour Photosensitizers. *Biochem. J.* **1989**, 261 (1), 277–280. <https://doi.org/10.1042/bj2610277>.
- (79) Ball, D. J.; Vernon, D. I.; Brown, S. B. Research Note: The High Photoactivity of m-THPC in Photodynamic Therapy. Unusually Strong Retention of m-THPC by RIF-1 Cells in Culture. *Photochem. Photobiol.* **1999**, 69 (3), 360–363. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1999.tb03299.x>.
- (80) Ronn, A. M.; Nouri, M.; Lofgren, L. A.; Steinberg, B. M.; Westerborn, A.; Windahl, T.; Shikowitz, M. J.; Abramson, A. L. Human Tissue Levels and Plasma Pharmacokinetics of Temoporfin (Foscan®, mTHPC). *Lasers Med. Sci.* **1996**, 11 (4), 267–272. <https://doi.org/10.1007/BF02134918>.
- (81) Pandey, R. K.; Sumlin, A. B.; Constantine, S.; Aoudia, M.; Potter, W. R.; Bellnier, D. A.; Henderson, B. W.; Rodgers, M. A.; Smith, K. M.; Dougherty, T. J. Alkyl Ether Analogs of Chlorophyll-a Derivatives: Part 1. Synthesis, Photophysical Properties and Photodynamic Efficacy. *Photochem. Photobiol.* **1996**, 64 (1), 194–204. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1996.tb02442.x>.

- (82) Spikes, J. D.; Bommer, J. C. Photosensitizing Properties of Mono-l-Aspartyl Chlorin E6 (NPe6): A Candidate Sensitizer for the Photodynamic Therapy of Tumors. *J. Photochem. Photobiol. B* **1993**, *17* (2), 135–143. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(93\)80006-U](https://doi.org/10.1016/1011-1344(93)80006-U).
- (83) Tomé, A. C.; Lacerda, P. S. S.; Neves, M. G. P. M. S.; Cavaleiro, J. A. S. Meso-Arylporphyrins as Dienophiles in Diels–Alderreactions: A Novel Approach to the Synthesis of Chlorins, Bacteriochlorins and Naphthoporphyrins. *Chem. Commun.* **1997**, No. 13, 1199–1200. <https://doi.org/10.1039/A702504A>.
- (84) Rausch, V.; Hansen, C. G. The Hippo Pathway, YAP/TAZ, and the Plasma Membrane. *Trends Cell Biol.* **2020**, *30* (1), 32–48. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.10.005>.
- (85) Allison, R. R.; Mang, T. S.; Wilson, B. D.; Vongtama, V. Tin Ethyl Etiopurpurin—Induced Photodynamic Therapy for the Treatment of Human Immunodeficiency Virus—Associated Kaposi’s Sarcoma. *Curr. Ther. Res.* **1998**, *59* (1), 23–27. [https://doi.org/10.1016/S0011-393X\(98\)85020-0](https://doi.org/10.1016/S0011-393X(98)85020-0).
- (86) Blumenkranz, M. S.; Woodburn, K. W.; Qing, F.; Verdooner, S.; Kessel, D.; Miller, R. Lutetium Texaphyrin (Lu-Tex): A Potential New Agent for Ocular Fundus Angiography and Photodynamic Therapy. *Am. J. Ophthalmol.* **2000**, *129* (3), 353–362. [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(99\)00462-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(99)00462-6).
- (87) Brilkina, A. A.; Dubasova, L. V.; Sergeeva, E. A.; Pospelov, A. J.; Shilyagina, N. Y.; Shakhova, N. M.; Balalaeva, I. V. Photobiological Properties of Phthalocyanine Photosensitizers Photosens, Holosens and Phthalosens: A Comparative *in Vitro* Analysis. *J. Photochem. Photobiol. B* **2019**, *191*, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.12.020>.
- (88) Das, R.; Kumar Verma, P.; Nagaraja, C. M. Design of Porphyrin-Based Frameworks for Artificial Photosynthesis and Environmental Remediation: Recent Progress and Future Prospects. *Coord. Chem. Rev.* **2024**, *514*, 215944. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2024.215944>.
- (89) Jurow, M.; Schuckman, A. E.; Batteas, J. D.; Drain, C. M. Porphyrins as Molecular Electronic Components of Functional Devices. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254* (19), 2297–2310. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.05.014>.
- (90) Suksai, C.; Tuntulani, T. Chromogenic Anion Sensors. *Chem. Soc. Rev.* **2003**, *32* (4), 192–202. <https://doi.org/10.1039/B209598J>.
- (91) Di Natale, C.; Paolesse, R.; Martinelli, E.; Capuano, R. Solid-State Gas Sensors for Breath Analysis: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *824*, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.03.014>.
- (92) Wang, S.; Kang, Y.; Wang, L.; Zhang, H.; Wang, Y.; Wang, Y. Organic/Inorganic Hybrid Sensors: A Review. *Sens. Actuators B Chem.* **2013**, *182*, 467–481. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.03.042>.
- (93) Collet, F.; Lescot, C.; Dauban, P. Catalytic C–H Amination: The Stereoselectivity Issue. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (4), 1926–1936. <https://doi.org/10.1039/C0CS00095G>.
- (94) Lu, H.; Zhang, X. P. Catalytic C–H Functionalization by Metalloporphyrins: Recent Developments and Future Directions. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (4), 1899–1909. <https://doi.org/10.1039/C0CS00070A>.
- (95) *Oxygen Activation and Radical Transformations in Heme Proteins and Metalloporphyrins* | *Chemical Reviews*.

- <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrev.7b00373> (accessed 2025-03-28).
- (96) *Porphyrin–Gold Nanomaterial for Efficient Drug Delivery to Cancerous Cells* | ACS Omega. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.8b00419> (accessed 2025-03-28).
 - (97) Zhou, Y.; Liang, X.; Dai, Z. Porphyrin-Loaded Nanoparticles for Cancer Theranostics. *Nanoscale* **2016**, *8* (25), 12394–12405. <https://doi.org/10.1039/C5NR07849K>.
 - (98) Abdulaeva, I. A.; Birin, K. P.; Bessmertnykh-Lemeune, A.; Tsivadze, A. Yu.; Gorbunova, Y. G. Heterocycle-Appended Porphyrins: Synthesis and Challenges. *Coord. Chem. Rev.* **2020**, *407*, 213108. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.213108>.
 - (99) Spasojević, I.; Colvin, O. M.; Warshany, K. R.; Batinić-Haberle, I. New Approach to the Activation of Anti-Cancer pro-Drugs by Metalloporphyrin-Based Cytochrome P450 Mimics in All-Aqueous Biologically Relevant System. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100* (11), 1897–1902. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.07.013>.
 - (100) Larkum, A. W. D.; Kühl, M. Chlorophyll d: The Puzzle Resolved. *Trends Plant Sci.* **2005**, *10* (8), 355–357. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.06.005>.
 - (101) Brown, K. L. Chemistry and Enzymology of Vitamin B12. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (6), 2075–2150. <https://doi.org/10.1021/cr030720z>.
 - (102) Gianferrara, T.; Bergamo, A.; Bratsos, I.; Milani, B.; Spagnul, C.; Sava, G.; Alessio, E. Ruthenium–Porphyrin Conjugates with Cytotoxic and Phototoxic Antitumor Activity. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (12), 4678–4690. <https://doi.org/10.1021/jm1002588>.
 - (103) Lottner, C.; Bart, K.-C.; Bernhardt, G.; Brunner, H. Hematoporphyrin-Derived Soluble Porphyrin–Platinum Conjugates with Combined Cytotoxic and Phototoxic Antitumor Activity. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (10), 2064–2078. <https://doi.org/10.1021/jm0110688>.
 - (104) Vizzotto, B. S.; Dias, R. S.; Iglesias, B. A.; Krause, L. F.; Viana, A. R.; Schuch, A. P. DNA Photocleavage and Melanoma Cells Cytotoxicity Induced by a Meso-Tetra-Ruthenated Porphyrin under Visible Light Irradiation. *J. Photochem. Photobiol. B* **2020**, *209*, 111922. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111922>.
 - (105) Zuba, I.; Zuba, M.; Piotrowski, M.; Pawlukojć, A. Ruthenium as an Important Element in Nuclear Energy and Cancer Treatment. *Appl. Radiat. Isot.* **2020**, *162*, 109176. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2020.109176>.
 - (106) *Ruthenium in Medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects* | Johnson Matthey Technology Review. <https://technology.matthey.com/content/journals/10.1595/003214001X4526269> (accessed 2025-03-28).
 - (107) Alessio, E. Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, *2017* (12), 1549–1560. <https://doi.org/10.1002/ejic.201600986>.
 - (108) Adhireksan, Z.; Davey, G. E.; Campomanes, P.; Groessl, M.; Clavel, C. M.; Yu, H.; Nazarov, A. A.; Yeo, C. H. F.; Ang, W. H.; Dröge, P.; Rothlisberger, U.; Dyson, P. J.; Davey, C. A. Ligand Substitutions between Ruthenium–

- Cymene Compounds Can Control Protein versus DNA Targeting and Anticancer Activity. *Nat. Commun.* **2014**, *5* (1), 3462. <https://doi.org/10.1038/ncomms4462>.
- (109) Miyata, K.; Yasuda, S.; Masuya, T.; Ito, S.; Kinoshita, Y.; Tamiaki, H.; Oba, T. Facile Iodination of the Vinyl Groups in Protoporphyrin IX Dimethyl Ester and Subsequent Transformation of the Iodinated Moieties. *Tetrahedron* **2018**, *74* (27), 3707–3711. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.05.040>.
- (110) M'Hiri, T.; Catusse, Ch.; Catusse, R.; Janier Dubry, J. L. Polymerization of Benzyl Alcohol and Its Derived Compounds with an Ion Exchange Resin. *React. Kinet. Catal. Lett.* **1983**, *22* (3), 425–428. <https://doi.org/10.1007/BF02066216>.
- (111) Gregoritz, M.; Brandl, F. P. The Diels–Alder Reaction: A Powerful Tool for the Design of Drug Delivery Systems and Biomaterials. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *97*, 438–453. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.06.007>.
- (112) Diels–Alder Reaction Compilation. In *The Diels–Alder Reaction*; John Wiley & Sons, Ltd, 2001; pp 301–330. <https://doi.org/10.1002/0470845813.ch7>.
- (113) Tsutsui, M.; Velapoldi, R. A.; Suzuki, K.; Vohwinkel, F.; Ichikawa, M.; Koyano, T. Unusual Metalloporphyrins. IV. Novel Methods for Metal Insertion into Porphyrins. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91* (23), 6262–6266. <https://doi.org/10.1021/ja01051a013>.
- (114) Rebouças, J. S.; James, B. R. Ruthenium(II) Complexes of Meso-Tetrakis(4-Cyanophenyl)Porphyrin. *Inorg. Chem. Commun.* **2013**, *30*, 49–52. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2013.01.010>.
- (115) ChemInform Abstract: Redox properties of metalloporphyrin excited states, lifetimes, and related properties of a series of para-substituted tetraphenylporphine carbonyl complexes of ruthenium(II) - Rillema - 1981 - Chemischer Informationsdienst - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/chin.198116307> (accessed 2025-03-28).
- (116) X-ray Structures and Homolysis of Some Alkylcobalt(III) Phthalocyanine Complexes | *Inorganic Chemistry*. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ic051078p> (accessed 2025-03-28).
- (117) Synthesis and Reactivity of Group Six Metal PCP Pincer Complexes: Reversible CO Addition Across the Metal–Caryl Bond | *Organometallics*. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.organomet.8b00447> (accessed 2025-03-28).
- (118) Chow, B. C.; Cohen, I. A. Derivatives of Tetraphenylporphineruthenium (II). *Bioinorg. Chem.* **1971**, *1* (1), 57–63. [https://doi.org/10.1016/S0006-3061\(71\)80001-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3061(71)80001-7).
- (119) Tsutsui, M.; Hsung, C. P. Unusual Metalloporphyrins. In *Organotransition-Metal Chemistry*; Ishii, Y., Tsutsui, M., Eds.; Springer US: Boston, MA, 1975; pp 355–368. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2142-2_33.
- (120) Matiková-Mařarová, M.; Novotná, R.; Trávníček, Z. X-Ray Structures and Spectral Characterization of Simple Ruthenium(II) Nitrosyl Complexes Involving the [RuCl₄(NO)(DMSO)][–] or [RuCl₄(NO)(H₂O)][–] Complex Anions. *J. Mol. Struct.* **2010**, *977* (1), 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2010.05.033>.

- (121) *ChemInform Abstract: Redox properties of metalloporphyrin excited states, lifetimes, and related properties of a series of para-substituted tetraphenylporphine carbonyl complexes of ruthenium(II) - Rillema - 1981 - Chemischer Informationsdienst - Wiley Online Library.* <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/chin.198116307> (accessed 2025-03-28).
- (122) Thandiayyakone, V.; Murugan, A.; Ravikumar, C. R.; Rajkumar, T.; Thillai Arasu, P.; Yadav, H. S.; Kotteeswaran, P. Studies on Redox and Axial Ligand Properties of Meso-Mn(III) Porphyrin by Cyclic Voltammetry and UV–Visible Spectrophotometry. *Mater. Today Proc.* **2021**, *47*, 933–937. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.04.621>.
- (123) Wang, X.; Lv, H.; Sun, Y.; Zu, G.; Zhang, X.; Song, Y.; Zhao, F.; Wang, J. New Porphyrin Photosensitizers—Synthesis, Singlet Oxygen Yield, Photophysical Properties and Application in PDT. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2022**, *279*, 121447. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121447>.
- (124) Taniguchi, M.; Lindsey, J. S. Synthetic Chlorins, Possible Surrogates for Chlorophylls, Prepared by Derivatization of Porphyrins. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (2), 344–535. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00696>.
- (125) Uchoa, A. F.; de Oliveira, K. T.; Baptista, M. S.; Bortoluzzi, A. J.; Iamamoto, Y.; Serra, O. A. Chlorin Photosensitizers Sterically Designed To Prevent Self-Aggregation. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (21), 8824–8832. <https://doi.org/10.1021/jo201568n>.
- (126) Dar, U. A.; Shah, S. A. UV–Visible and Fluorescence Spectroscopic Assessment of Meso-tetrakis-(4-halophenyl) Porphyrin; H₂TXPP (X = F, Cl, Br, I) in THF and THF-Water System: Effect of pH and Aggregation Behaviour. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2020**, *240*, 118570. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118570>.
- (127) Dardouri, N. E.; Mkacher, H.; Ghalla, H.; Amor, F. B.; Hamdaoui, N.; Nasri, S.; Roisnel, T.; Nasri, H. Synthesis and Characterization of a New Cyanato-*N* Cadmium(II) Meso-Arylporphyrin Complex by X-Ray Diffraction Analysis, IR, UV/Vis, ¹H MNR Spectroscopies and TDDFT Calculations, Optical and Electrical Properties. *J. Mol. Struct.* **2023**, *1287*, 135559. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.135559>.
- (128) Comer, J. E. A. High-Throughput Measurement of Log D and pK_a. In *Drug Bioavailability*; John Wiley & Sons, Ltd, 2003; pp 21–45. <https://doi.org/10.1002/3527601473.ch2>.
- (129) Stephan, K.; Saab, J.; Mokbel, I.; Goutaudier, C.; Ferrigno, R. Continuous-Flow Microfluidic Method for Octanol-Water Partition Coefficient Measurement. *Fluid Phase Equilibria* **2014**, *380*, 116–120. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2014.07.033>.
- (130) Corgne, A.; Siebert, J. Calculating Partition Coefficients of Trace Elements to Model Earth's Interior Processes. In *Treatise on Geochemistry (Third edition)*; Anbar, A., Weis, D., Eds.; Elsevier: Oxford, 2025; pp 439–462. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99762-1.00132-7>.
- (131) Otvagin, V. F.; Kuzmina, N. S.; Kudriashova, E. S.; Nyuchev, A. V.; Gavryushin, A. E.; Fedorov, A. Yu. Conjugates of Porphyrinoid-Based Photosensitizers with Cytotoxic Drugs: Current Progress and Future

- Directions toward Selective Photodynamic Therapy. *J. Med. Chem.* **2022**, 65 (3), 1695–1734. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01953>.
- (132) *Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer - Analyst* (RSC Publishing). <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1983/an/an9830801067> (accessed 2025-03-28).
- (133) Baskin, J. S.; Yu, H.-Z.; Zewail, A. H. Ultrafast Dynamics of Porphyrins in the Condensed Phase: I. Free Base Tetraphenylporphyrin. *J. Phys. Chem. A* **2002**, 106 (42), 9837–9844. <https://doi.org/10.1021/jp020398g>.
- (134) Nasri, H. Porphyrins and Metalloporphyrins: An Overview. In *2020 IEEE International Conference on Design & Test of Integrated Micro & Nano-Systems (DTS)*; 2020; pp 1–6. <https://doi.org/10.1109/DTS48731.2020.9196129>.
- (135) Zheng, W.; Shan, N.; Yu, L.; Wang, X. UV–Visible, Fluorescence and EPR Properties of Porphyrins and Metalloporphyrins. *Dyes Pigments* **2008**, 77 (1), 153–157. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2007.04.007>.
- (136) Gusmão, L. A.; Machado, A. E. H.; Perussi, J. R. Improved Hypericin Solubility via β -Cyclodextrin Complexation: Photochemical and Theoretical Study for PDT Applications. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2022**, 40, 103073. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103073>.
- (137) Kang, Y.-F.; Chen, W.-K.; Teng, K.-X.; Wang, L.-Y.; Xu, X.-C.; Niu, L.-Y.; Cui, G.; Yang, Q.-Z. Aggregation Turns BODIPY Fluorophores into Photosensitizers: Reversibly Switching Intersystem Crossing On and Off for Smart Photodynamic Therapy. *CCS Chem.* **2022**, 4 (11), 3516–3528. <https://doi.org/10.31635/ccschem.021.202101600>.
- (138) Silva, A. R. A.; Simioni, A. R.; Tedesco, A. C. Photophysical and Complexation Studies of Chloro-Aluminum Phthalocyanine with Beta-Cyclodextrin and Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2011**, 11 (5), 4046–4055. <https://doi.org/10.1166/jnn.2011.3823>.
- (139) Wu, W.; Shao, X.; Zhao, J.; Wu, M. Controllable Photodynamic Therapy Implemented by Regulating Singlet Oxygen Efficiency. *Adv. Sci.* **2017**, 4 (7), 1700113. <https://doi.org/10.1002/advs.201700113>.
- (140) Xing, X.; Zhu, P.; Pang, E.; Zhao, S.; Tang, Y.; Hu, Z.; Ouyang, Q.; Lan, M. D-A-D-Structured Boron-Dipyrromethene with Aggregation-Induced Enhanced Phototherapeutic Efficiency for near-Infrared Fluorescent and Photoacoustic Imaging-Guided Synergistic Photodynamic and Photothermal Cancer Therapy. *Chin. Chem. Lett.* **2024**, 35 (10), 109452. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2023.109452>.
- (141) Lutkus, L. V.; Rickenbach, S. S.; McCormick, T. M. Singlet Oxygen Quantum Yields Determined by Oxygen Consumption. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2019**, 378, 131–135. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2019.04.029>.
- (142) de Assis, F. F.; de Souza, J. M.; Assis, B. H. K.; Brocksom, T. J.; de Oliveira, K. T. Synthesis and Photophysical Studies of a Chlorin Sterically Designed to Prevent Self-Aggregation. *Dyes Pigments* **2013**, 98 (1), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.02.011>.
- (143) Luis, E. T.; Ball, Graham E.; Gilbert, Alyssa; Iranmanesh, Hasti; Newdick, Connor W.; and Beves, J. E. Efficient Microwave-Assisted Synthesis and

- Characterization of Key Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes [Ru(Bpy)₃](PF₆)₂, [Ru(Phen)₃](PF₆)₂, [Ru(Bpy)₂(Phen)](PF₆)₂ and [Ru(Phen)₂(Bpy)](PF₆)₂. *J. Coord. Chem.* **2016**, 69 (11–13), 1686–1694. <https://doi.org/10.1080/00958972.2016.1194404>.
- (144) Benson, S.; de Moliner, F.; Fernandez, A.; Kuru, E.; Asiimwe, N. L.; Lee, J.-S.; Hamilton, L.; Sieger, D.; Bravo, I. R.; Elliot, A. M.; Feng, Y.; Vendrell, M. Photoactivatable Metabolic Warheads Enable Precise and Safe Ablation of Target Cells in Vivo. *Nat. Commun.* **2021**, 12 (1), 2369. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22578-2>.
- (145) Tan, G.; Wang, Q.; Zhang, H.; Cheng, J.; Wang, Z.; Qu, F.; Guo, C.; Jin, Y. The in Vitro Photodynamic Activity, Photophysical and Photochemical Research of a Novel Chlorophyll-Derived Photosensitizer. *Med. Chem. Res.* **2017**, 26 (10), 2639–2652. <https://doi.org/10.1007/s00044-017-1962-2>.
- (146) Neagu, M.; Constantin, C.; Tampa, M.; Matei, C.; Lupu, A.; Manole, E.; Ion, R.-M.; Fenga, C.; Tsatsakis, A. M. Toxicological and Efficacy Assessment of Post-Transition Metal (Indium) Phthalocyanine for Photodynamic Therapy in Neuroblastoma. *Oncotarget* **2016**, 7 (43), 69718–69732. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11942>.
- (147) Wang, Y.; Lin, Y.; He, S.; Wu, S.; Yang, C. Singlet Oxygen: Properties, Generation, Detection, and Environmental Applications. *J. Hazard. Mater.* **2024**, 461, 132538. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132538>.
- (148) Rey-Keim, S.; Schito, L. Origins and Molecular Effects of Hypoxia in Cancer. *Semin. Cancer Biol.* **2024**, 106–107, 166–178. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2024.10.001>.
- (149) Ashur, I.; Goldschmidt, R.; Pinkas, I.; Salomon, Y.; Szewczyk, G.; Sarna, T.; Scherz, A. Photocatalytic Generation of Oxygen Radicals by the Water-Soluble Bacteriochlorophyll Derivative WST11, Noncovalently Bound to Serum Albumin. *J. Phys. Chem. A* **2009**, 113 (28), 8027–8037. <https://doi.org/10.1021/jp900580e>.
- (150) Liu, X.; Li, G.; Xie, M.; Guo, S.; Zhao, W.; Li, F.; Liu, S.; Zhao, Q. Rational Design of Type I Photosensitizers Based on Ru(II) Complexes for Effective Photodynamic Therapy under Hypoxia. *Dalton Trans.* **2020**, 49 (32), 11192–11200. <https://doi.org/10.1039/D0DT01684E>.
- (151) Dąbrowski, J. M. Chapter Nine - Reactive Oxygen Species in Photodynamic Therapy: Mechanisms of Their Generation and Potentiation. In *Advances in Inorganic Chemistry*; van Eldik, R., Hubbard, C. D., Eds.; Inorganic Reaction Mechanisms; Academic Press, 2017; Vol. 70, pp 343–394. <https://doi.org/10.1016/bs.adioch.2017.03.002>.
- (152) Rovira, A.; Ortega-Forte, E.; Hally, C.; Jordà-Redondo, M.; Abad-Montero, D.; Vigueras, G.; Martínez, J. I.; Bosch, M.; Nonell, S.; Ruiz, J.; Marchán, V. Exploring Structure–Activity Relationships in Photodynamic Therapy Anticancer Agents Based on Ir(III)-COUPY Conjugates. *J. Med. Chem.* **2023**, 66 (12), 7849–7867. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c00189>.
- (153) Buettner, G. R. Spin Trapping: ESR Parameters of Spin Adducts 1474 1528V. *Free Radic. Biol. Med.* **1987**, 3 (4), 259–303. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(87\)80033-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(87)80033-3).

- (154) Mihmanli, M.; İlhan, E.; Idiz, U. O.; Alemdar, A.; Demir, U. Recent Developments and Innovations in Gastric Cancer. *World J. Gastroenterol.* **2016**, 22 (17), 4307–4320. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i17.4307>.
- (155) Kim, K.; Park, H.; Lim, K.-M. Phototoxicity: Its Mechanism and Animal Alternative Test Methods. *Toxicol. Res.* **2015**, 31 (2), 97–104. <https://doi.org/10.5487/TR.2015.31.2.097>.
- (156) *Photodynamic and Cold Atmospheric Plasma Combination Therapy Using Polymeric Nanoparticles for the Synergistic Treatment of Cervical Cancer.* <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/3/1172> (accessed 2025-03-29).
- (157) Fang, J.; Huang, X.; Yang, Y.; Wang, X.; Liang, X.; Liu, J. Berberine-Photodynamic Induced Apoptosis by Activating Endoplasmic Reticulum Stress-Autophagy Pathway Involving CHOP in Human Malignant Melanoma Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, 552, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.02.147>.
- (158) Lee, Y.-S.; Lee, D.-H.; Choudry, H. A.; Bartlett, D. L.; Lee, Y. J. Ferroptosis-Induced Endoplasmic Reticulum Stress: Cross-Talk between Ferroptosis and Apoptosis. *Mol. Cancer Res.* **2018**, 16 (7), 1073–1076. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-0055>.
- (159) Ochoa, C. D.; Wu, R. F.; Terada, L. S. ROS Signaling and ER Stress in Cardiovascular Disease. *Mol. Aspects Med.* **2018**, 63, 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.03.002>.
- (160) Zhao, T.; Wu, K.; Hogstrand, C.; Xu, Y.-H.; Chen, G.-H.; Wei, C.-C.; Luo, Z. Lipophagy Mediated Carbohydrate-Induced Changes of Lipid Metabolism via Oxidative Stress, Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and ChREBP/PPAR γ Pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* **2020**, 77 (10), 1987–2003. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03263-6>.
- (161) Luo, M.; Li, H.; Han, D.; Yang, K.; Kang, L. Inhibition of Autophagy Enhances Apoptosis Induced by Ce6-Photodynamic Therapy in Human Colon Cancer Cells. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2021**, 36, 102605. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102605>.
- (162) *ISO-upregulated BECN1 specifically promotes LC3B-dependent autophagy and anticancer activity in invasive bladder cancer - ScienceDirect.* <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1936523324003048?via%3Dihub> (accessed 2025-03-29).
- (163) Sun, Y.; Chen, P.; Zhai, B.; Zhang, M.; Xiang, Y.; Fang, J.; Xu, S.; Gao, Y.; Chen, X.; Sui, X.; Li, G. The Emerging Role of Ferroptosis in Inflammation. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, 127, 110108. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110108>.
- (164) Kajarabille, N.; Latunde-Dada, G. O. Programmed Cell-Death by Ferroptosis: Antioxidants as Mitigators. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20 (19), 4968. <https://doi.org/10.3390/ijms20194968>.
- (165) *The cell biology of ferroptosis | Nature Reviews Molecular Cell Biology.* <https://www.nature.com/articles/s41580-024-00703-5> (accessed 2025-03-29).
- (166) Friedmann Angeli, J. P.; Krysko, D. V.; Conrad, M. Ferroptosis at the Crossroads of Cancer-Acquired Drug Resistance and Immune Evasion. *Nat. Rev. Cancer* **2019**, 19 (7), 405–414. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0149-1>.

- (167) Stejerean-Todoran, I.; Gibhardt, C. S.; Bogeski, I. Calcium Signals as Regulators of Ferroptosis in Cancer. *Cell Calcium* **2024**, *124*, 102966. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2024.102966>.
- (168) Zhou, Y.; Zhou, X.; Dong, W.; Zhang, Y.; Du, J.; Zhou, X.; Fang, W.; Wang, X.; Song, H. Porcine Circovirus Type 2 Induces CHOP-ERO1 α -ROS-Mediated Apoptosis in PK-15 Cells. *Vet. Microbiol.* **2022**, *273*, 109548. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109548>.
- (169) Cyclooxygenase 2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis - Kuwano - 2004 - The FASEB Journal - Wiley Online Library. <https://faseb-onlinelibrary-wiley-com.pbidi.unam.mx:2443/doi/full/10.1096/fj.03-0473com> (accessed 2025-03-29).
- (170) Nitric oxide synthase, cyclooxygenase 2, and vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of non-small cell lung carcinoma - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11156228/> (accessed 2025-03-29).
- (171) Rae, S. A.; Davidson, E. M.; Smith, M. J. H. LEUKOTRIENE B₄, AN INFLAMMATORY MEDIATOR IN GOUT. *The Lancet* **1982**, *320* (8308), 1122–1124. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(82\)92785-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(82)92785-4).
- (172) Fauré, M.; Saccavini, C.; Lavigne, G. New Insight into a Convenient Base-Promoted Synthesis of Ru₃(CO)₁₂. *Chem. Commun.* **2003**, No. 13, 1578–1579. <https://doi.org/10.1039/B303884J>.
- (173) Morgan, A. R.; Kohli, D. H. Diels-Alder Reactions of Protoporphyrin Ix Dimethyl Ester. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36* (42), 7603–7606. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(95\)01633-S](https://doi.org/10.1016/0040-4039(95)01633-S).
- (174) de Oliveira, K. T.; Silva, A. M. S.; Tomé, A. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Neri, C. R.; Garcia, V. S.; Serra, O. A.; Iamamoto, Y.; Cavaleiro, J. A. S. Synthesis of New Amphiphilic Chlorin Derivatives from Protoporphyrin-IX Dimethyl Ester. *Tetrahedron* **2008**, *64* (37), 8709–8715. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.06.103>.
- (175) Bruker Software. <https://www.brukersupport.com/BrukerDownloads/2> (accessed 2025-03-29).
- (176) Linares, I. A. P.; de Oliveira, K. T.; Perussi, J. R. Chlorin Derivatives Sterically-Prevented from Self-Aggregation with High Antitumor Activity for Photodynamic Therapy. *Dyes Pigments* **2017**, *145*, 518–527. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.06.011>.
- (177) Andrés, A.; Rosés, M.; Ràfols, C.; Bosch, E.; Espinosa, S.; Segarra, V.; Huerta, J. M. Setup and Validation of Shake-Flask Procedures for the Determination of Partition Coefficients (*LogD*) from Low Drug Amounts. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *76*, 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.05.008>.
- (178) Ballester, F. J.; Ortega, E.; Bautista, D.; Santana, M. D.; Ruiz, J. Ru(II) Photosensitizers Competent for Hypoxic Cancers via Green Light Activation. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (71), 10301–10304. <https://doi.org/10.1039/D0CC02417A>.
- (179) Siahcheshm, P.; Heiden, P. High Quantum Yield Carbon Quantum Dots as Selective Fluorescent Turn-off Probes for Dual Detection of Fe²⁺/Fe³⁺ Ions. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2023**, *435*, 114284. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2022.114284>.

- (180) Li, Y.; Liu, Y.; Shang, X.; Chao, D.; Zhou, L.; Zhang, H. Highly Sensitive and Selective Detection of Fe³⁺ by Utilizing Carbon Quantum Dots as Fluorescent Probes. *Chem. Phys. Lett.* **2018**, *705*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2018.05.048>.
- (181) Seotsanyana-Mokhosi, I.; Kuznetsova, N.; Nyokong, T. Photochemical Studies of Tetra-2,3-Pyridinoporphyrazines. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2001**, *140* (3), 215–222. [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(01\)00427-0](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(01)00427-0).
- (182) Zhang, X.-F.; Li, X. The Photostability and Fluorescence Properties of Diphenylisobenzofuran. *J. Lumin.* **2011**, *131* (11), 2263–2266. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2011.05.048>.
- (183) Nardi, G.; Manet, I.; Monti, S.; Miranda, M. A.; Lhiaubet-Vallet, V. Scope and Limitations of the TEMPO/EPR Method for Singlet Oxygen Detection: The Misleading Role of Electron Transfer. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *77*, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.020>.
- (184) *Isoforms of the p53 Family and Gastric Cancer: A Ménage à Trois for an Unfinished Affair.* <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/4/916> (accessed 2025-03-29).
- (185) *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis | Nature Methods.* <https://www.nature.com/articles/nmeth.2089> (accessed 2025-03-29).

9. Publicación y conferencias

- Durante esta investigación se publicó el artículo:

Andrés Restrepo-Acevedo, María Isabel Murillo, Christophe Orvain, Chloé Thibaudeau, Sevda Recberlik, Lucas Verget, Virginia Gómez Vidales, Christian Gaidon, Georg Mellitzer and Ronan Le Lagadec. Protoporphyrin IX – derived ruthenium(II) complexes for photodynamic therapy in gastric cancer cells. *Inorg. Chem.* (2025). <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5c00896>.

- También se publicó un artículo de divulgación científica:

Lucas Verget, Maria Isabel Murillo Rodríguez, **Andrés Restrepo-Acevedo**, Ronan Le Lagadec. La terapia fotodinámica promete revolucionar el tratamiento del cáncer: Photodynamic Therapy Promises to Revolutionize Cancer Treatment, *TECNOCENCIA Chihuahua* 17 (2023) e1355. <https://doi.org/10.54167/tch.v17i4.1355>.

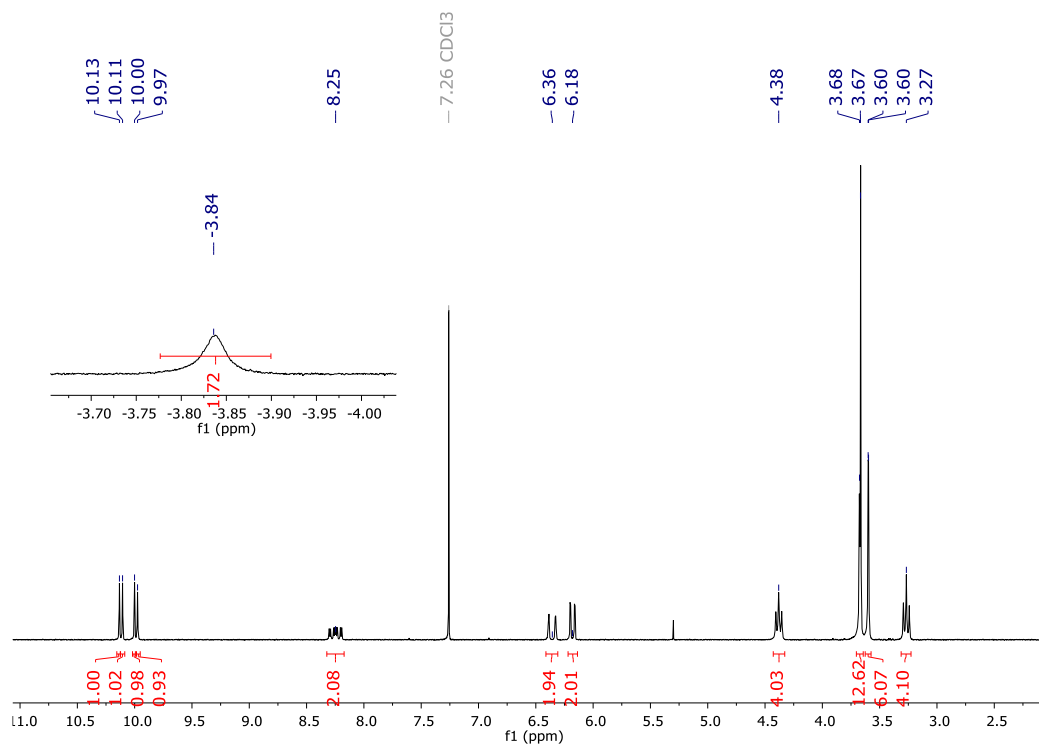
- Además, parte del trabajo fue presentado como cartel en los siguientes eventos:

Simposios Internos del Instituto de Química, UNAM, 2021 y 2022.

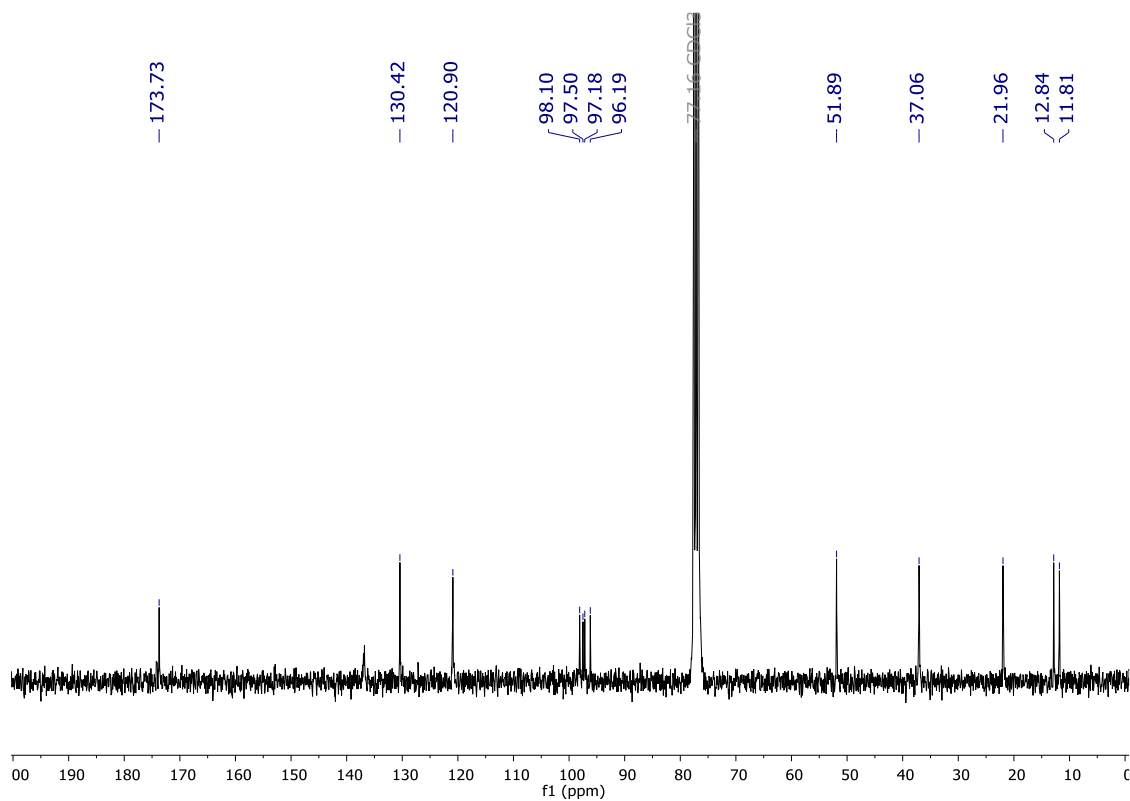
VIII Latin American Meeting of Biological Inorganic Chemistry, Synthesis of Ruthenium complexes with protoporphyrin IX-Derived Ligands and Evaluation of Their Biological Activity.
Abril 2023, Viña del Mar, Chile.

10. Anexos

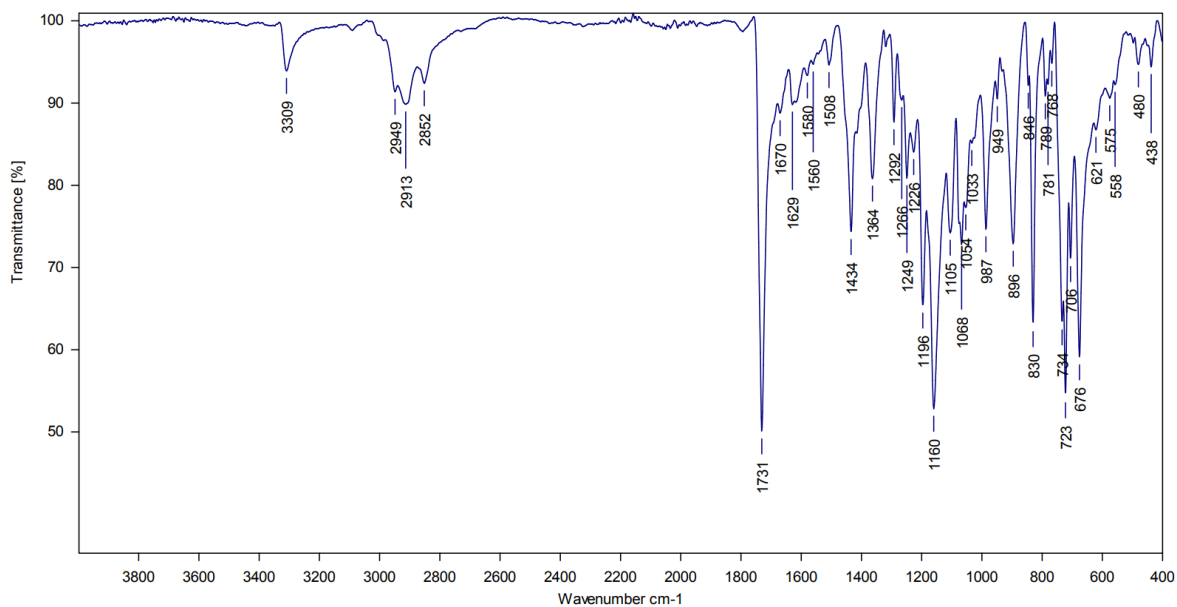
Anexo 1. Espectro RMN-¹H de **dMePpIX** en CDCl₃, 300 MHz.



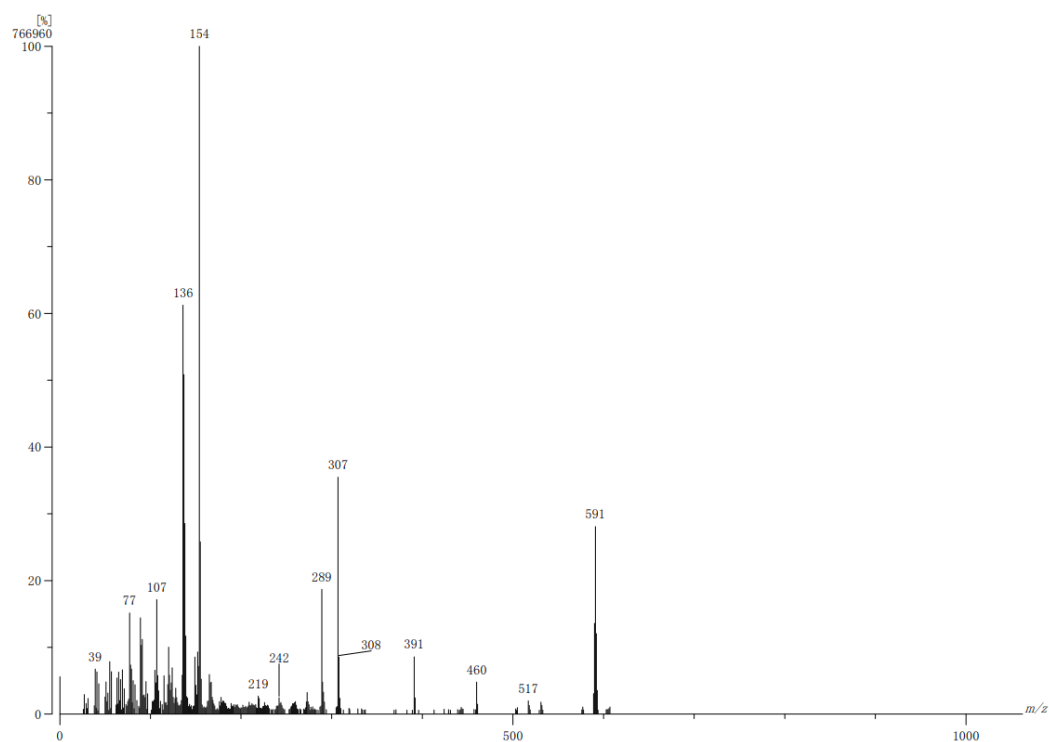
Anexo 2. Espectro RMN-¹³C de **dMePpIX** en CDCl₃, 75 MHz.



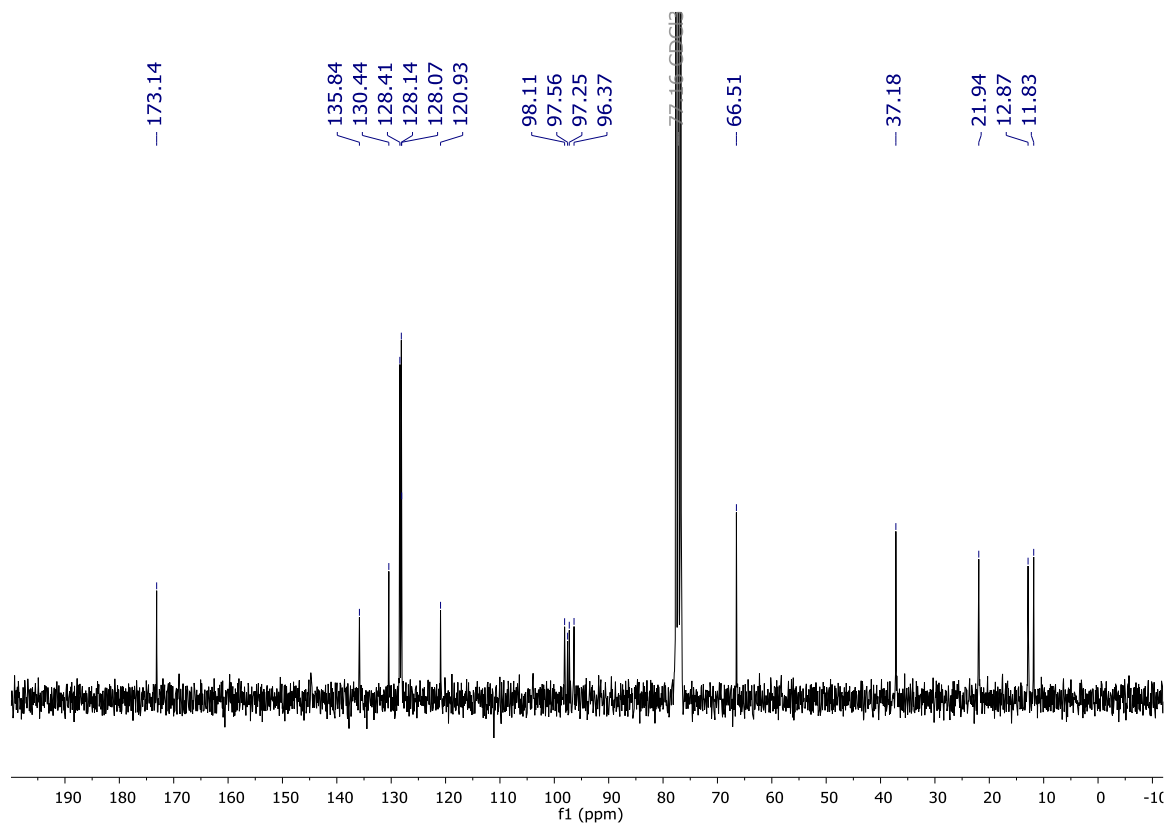
Anexo 3. Espectro FT-IR de dMePpIX.



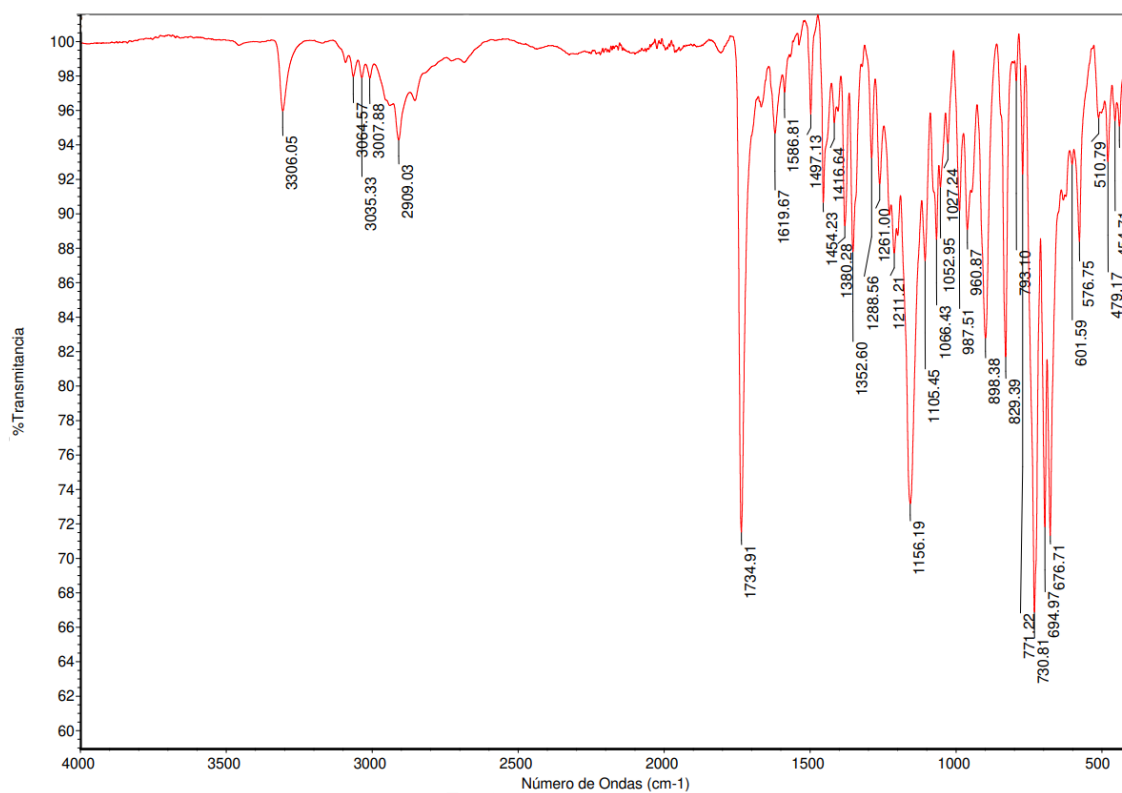
Anexo 4. Espectro MS-FAB⁺ de dMePpIX.



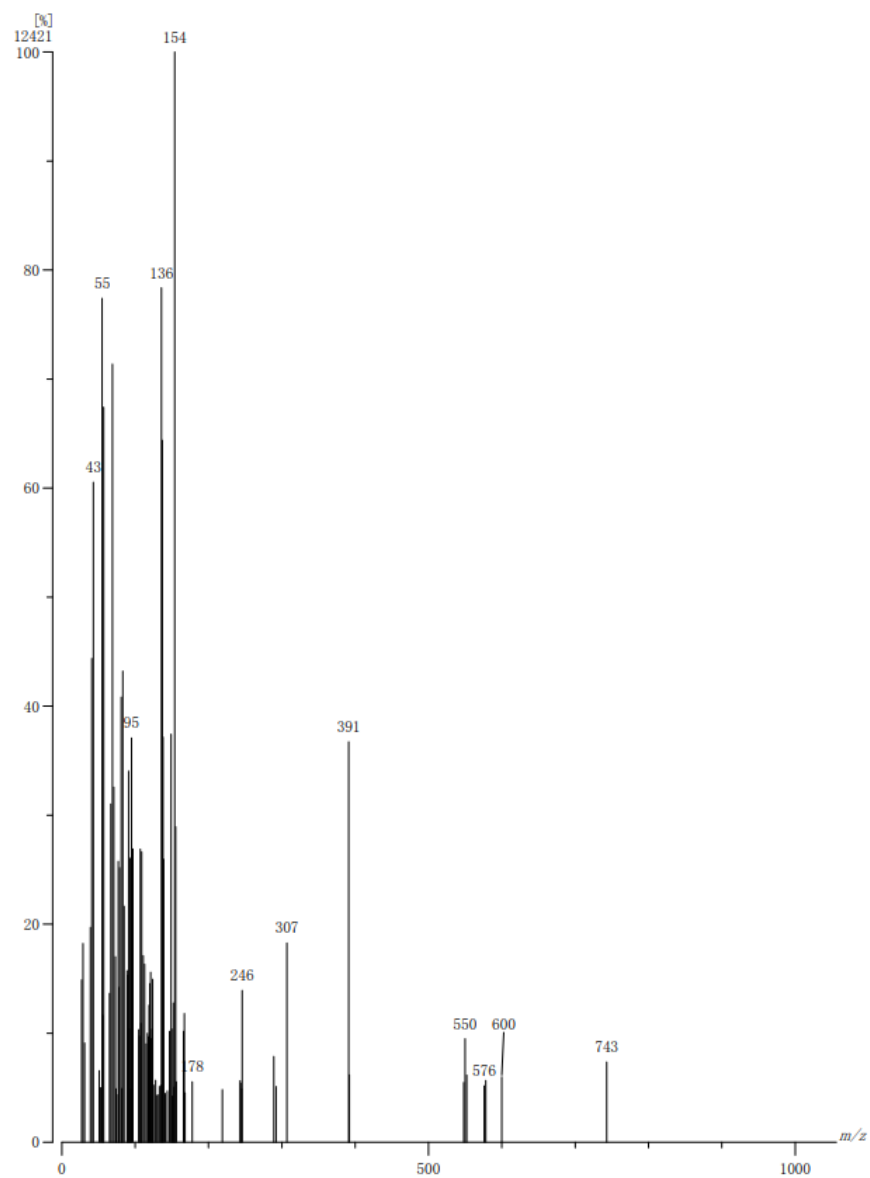
Anexo 5. Espectro RMN- ^{13}C de dBnPpIX en CDCl_3 , 75 MHz.



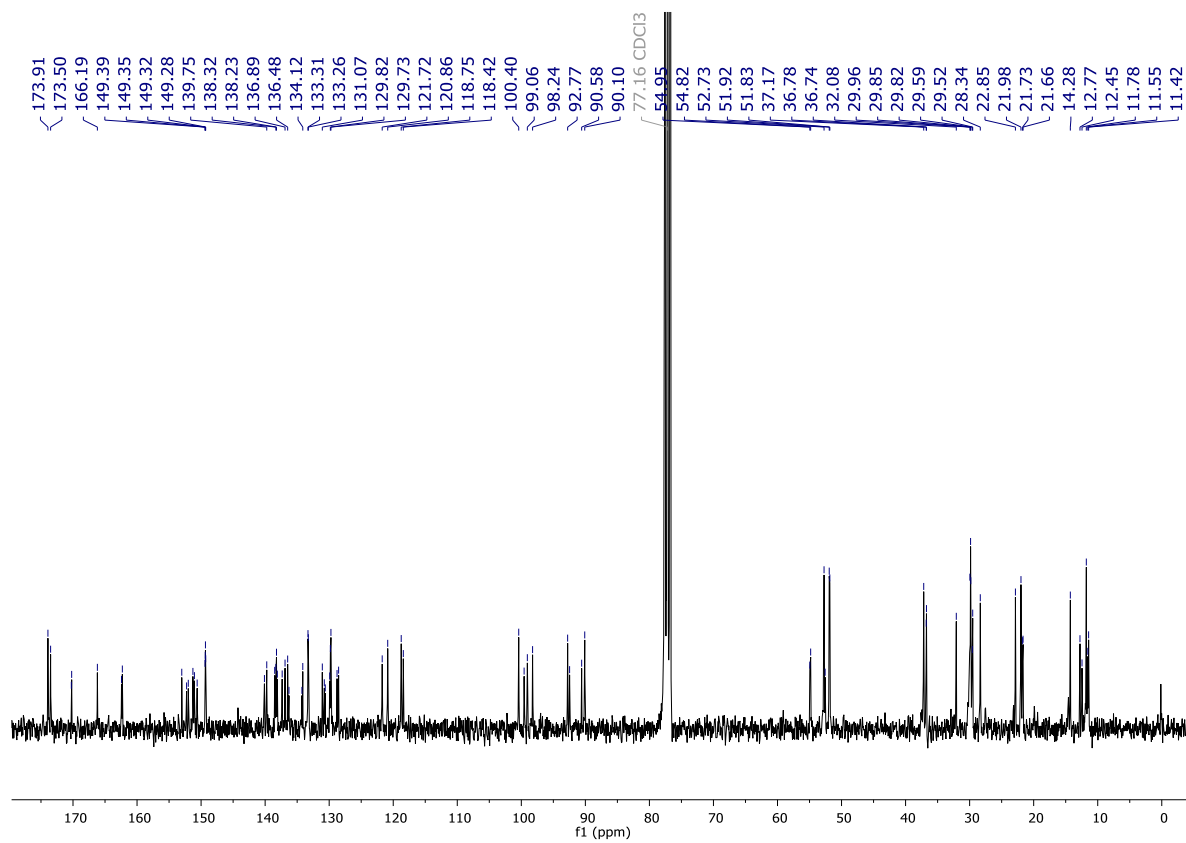
Anexo 6. Espectro FT-IR de dBnPpIX.



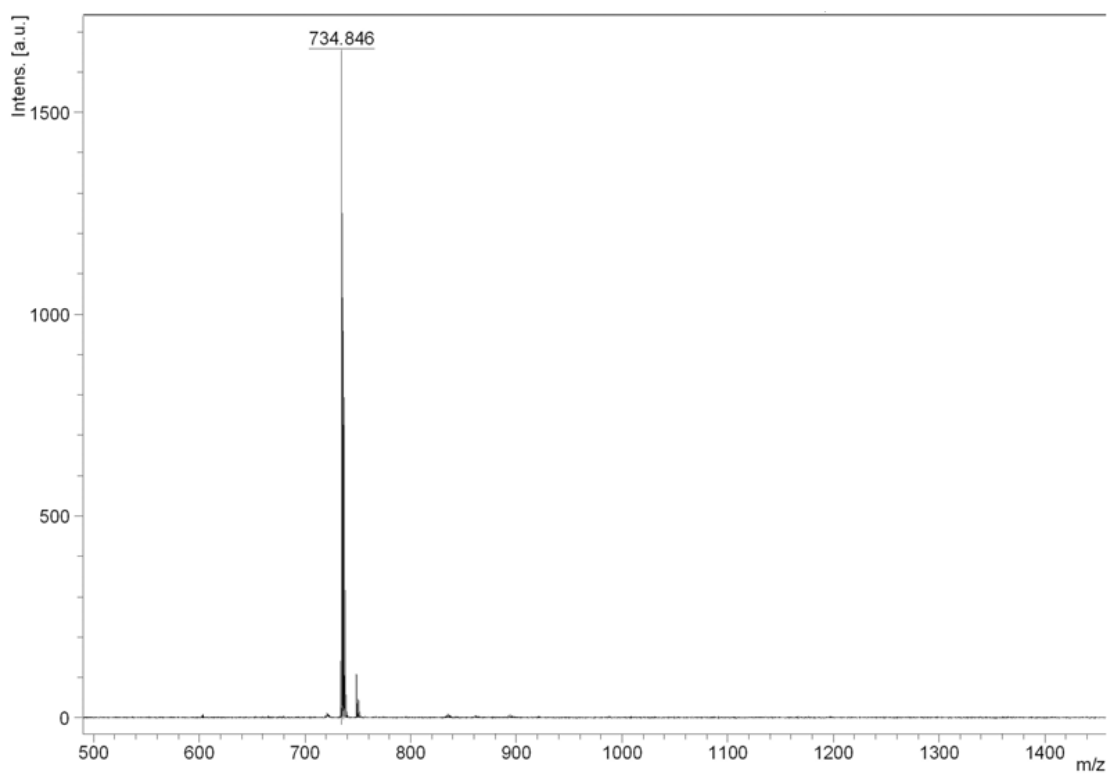
Anexo 7. Espectro MS-FAB⁺ de dBnPpIX.



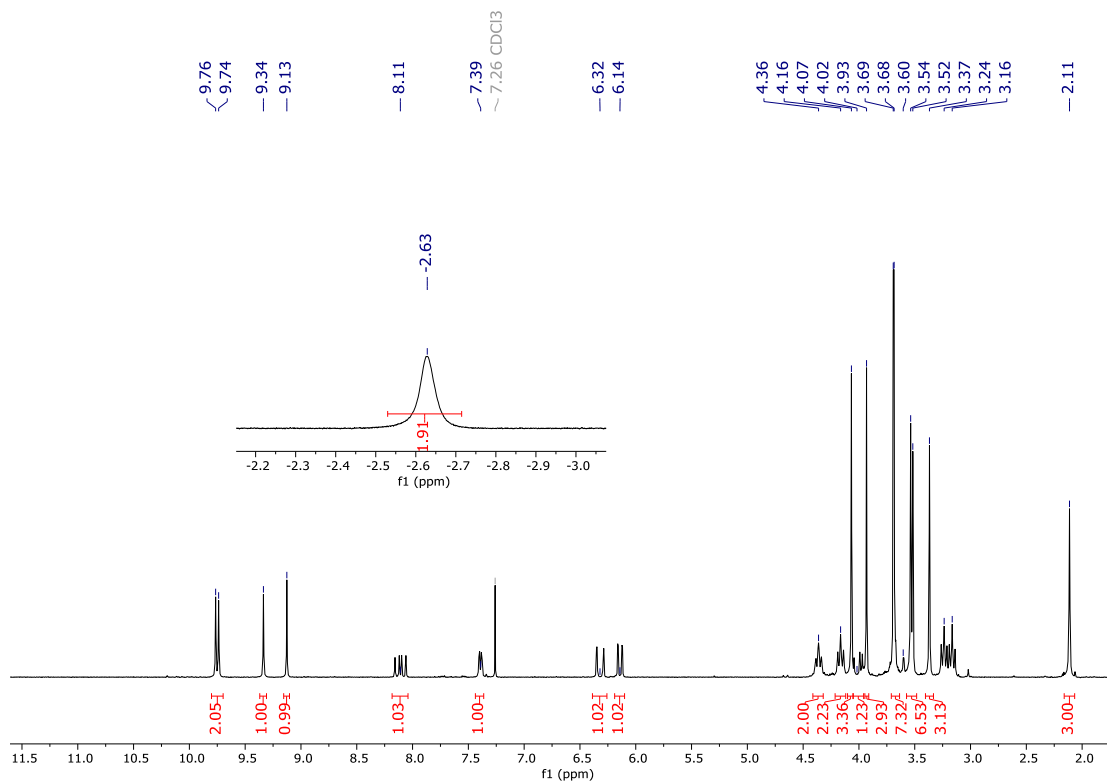
Anexo 8. Espectro RMN-¹³C de dMeCloAB en CDCl₃, 75 MHz.



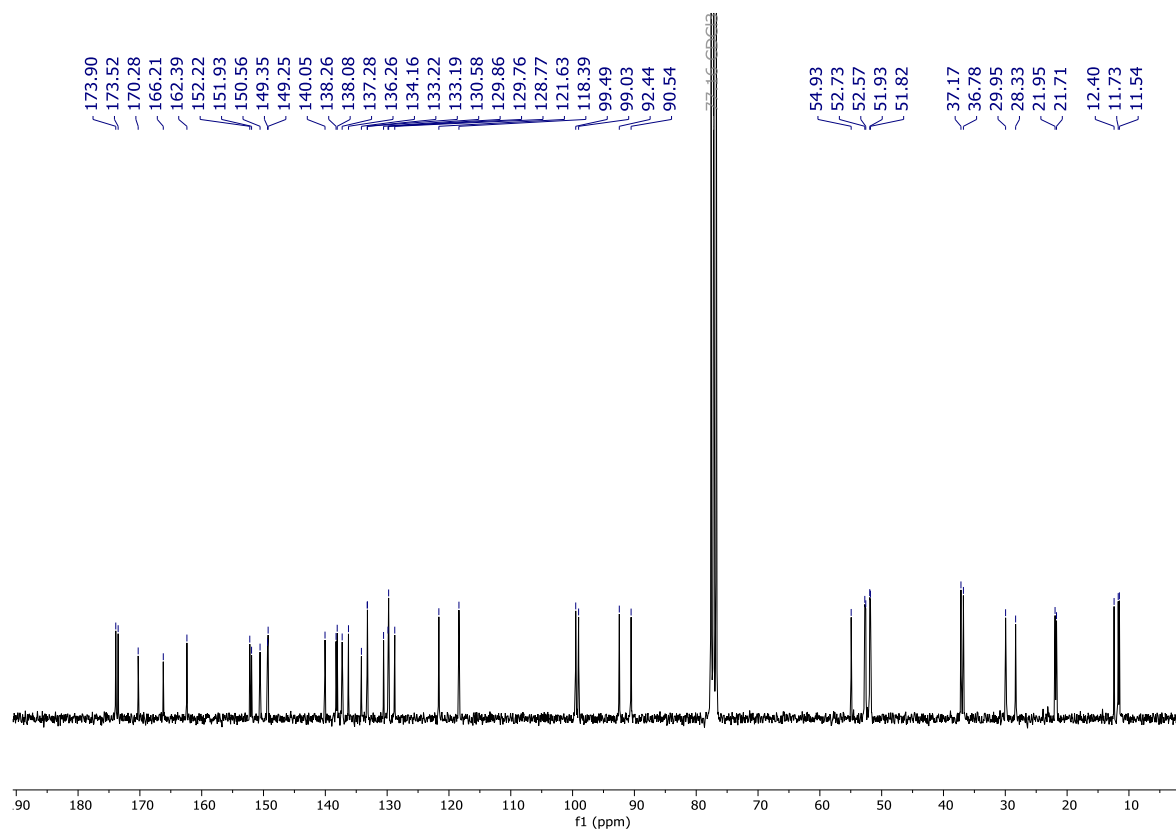
Anexo 9. Espectro MS-ESI de dMeCloAB.



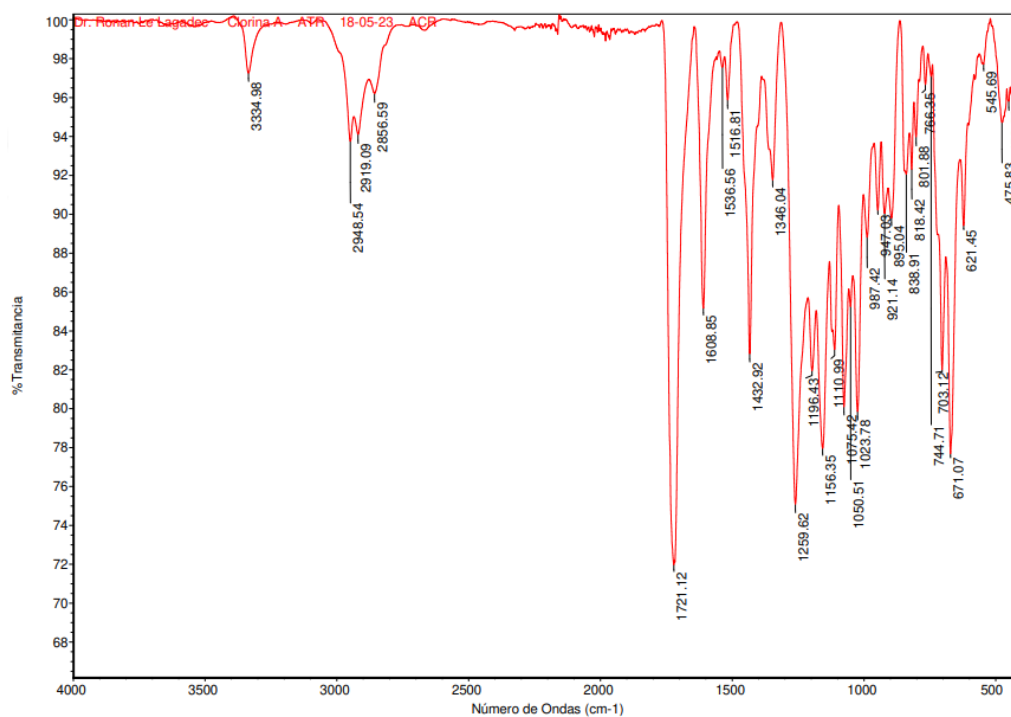
Anexo 10. Espectro RMN- ^1H de dMeCloA en CDCl_3 , 300 MHz.



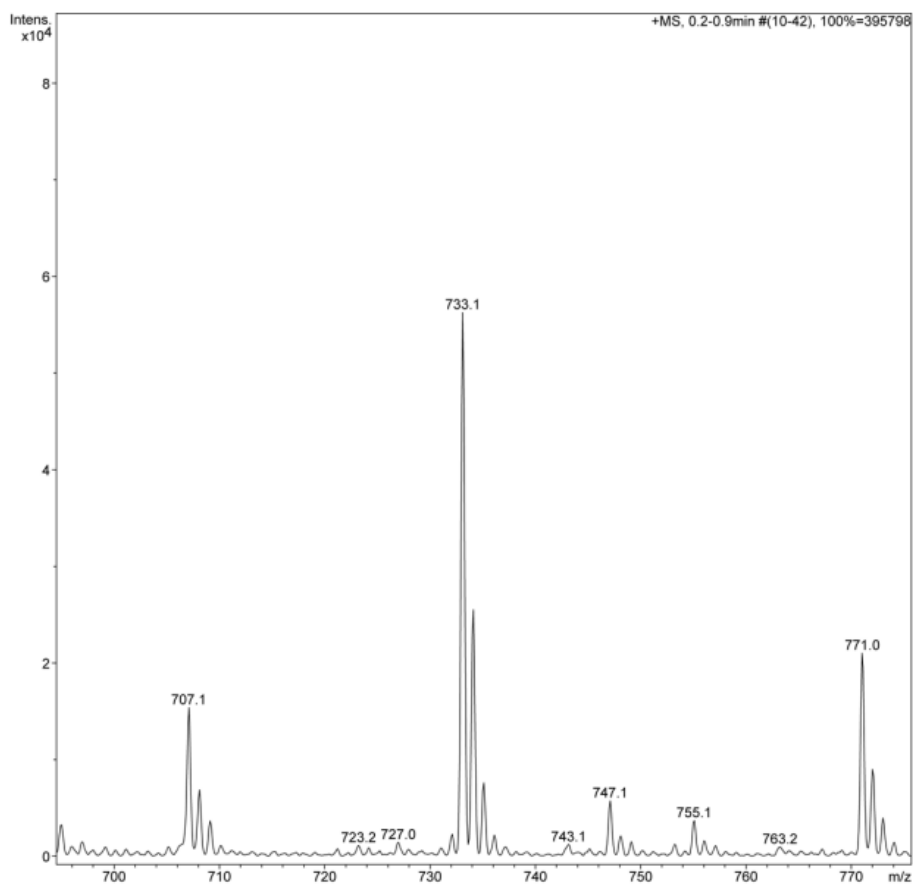
Anexo 11. Espectro RMN- ^{13}C de dMeCloA en CDCl_3 , 75 MHz.



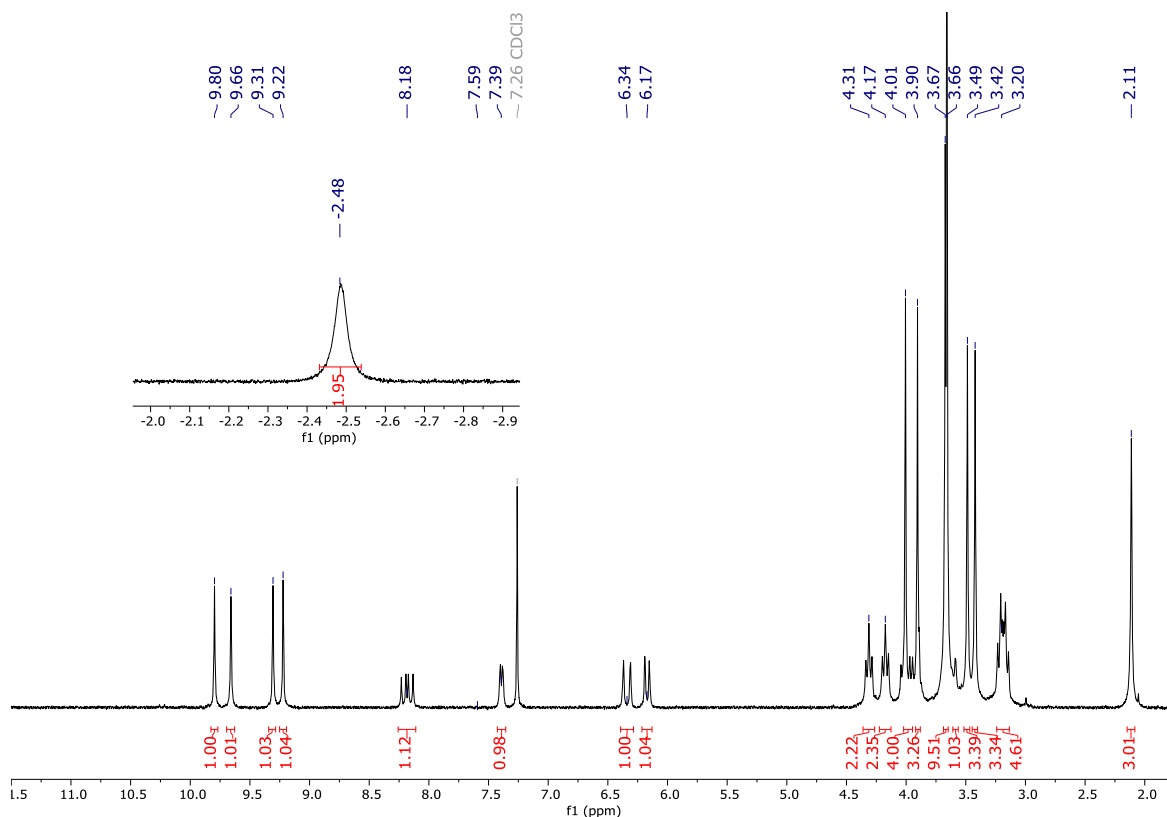
Anexo 12. Espectro FT-IR de dMeCloA.



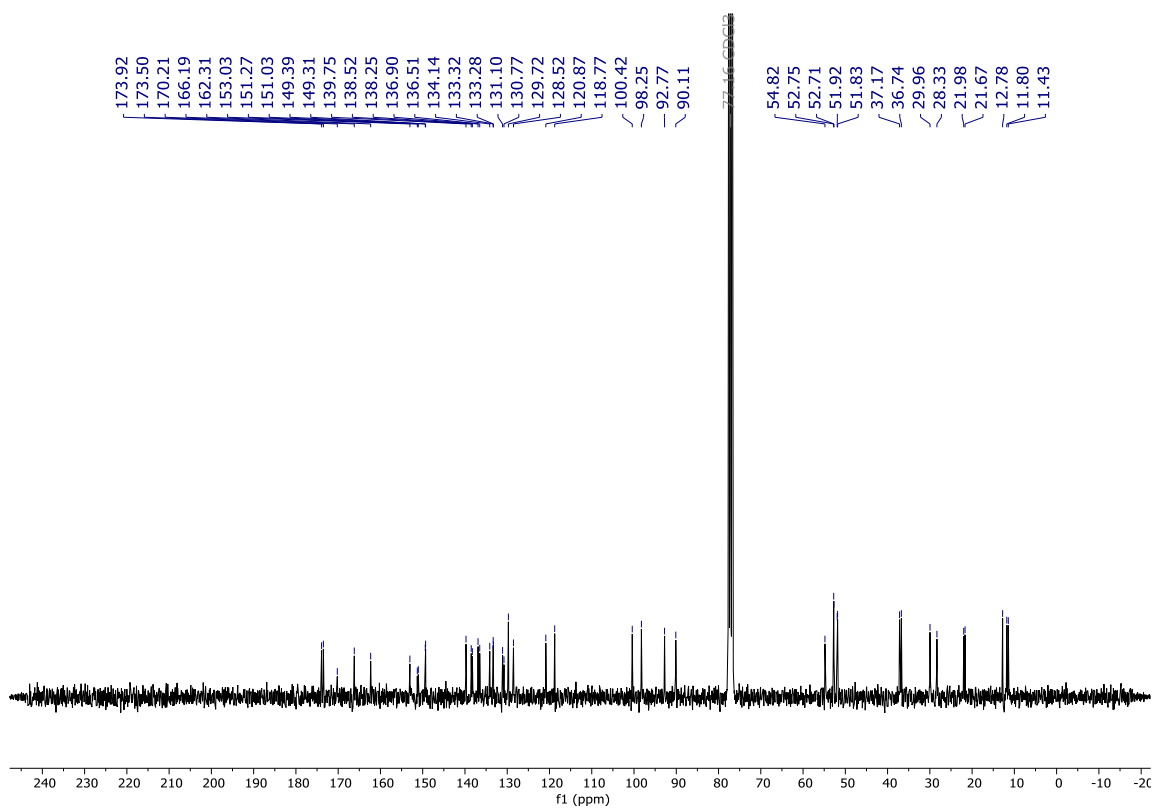
Anexo 13. Espectro MS-ESI de dMeCloA.



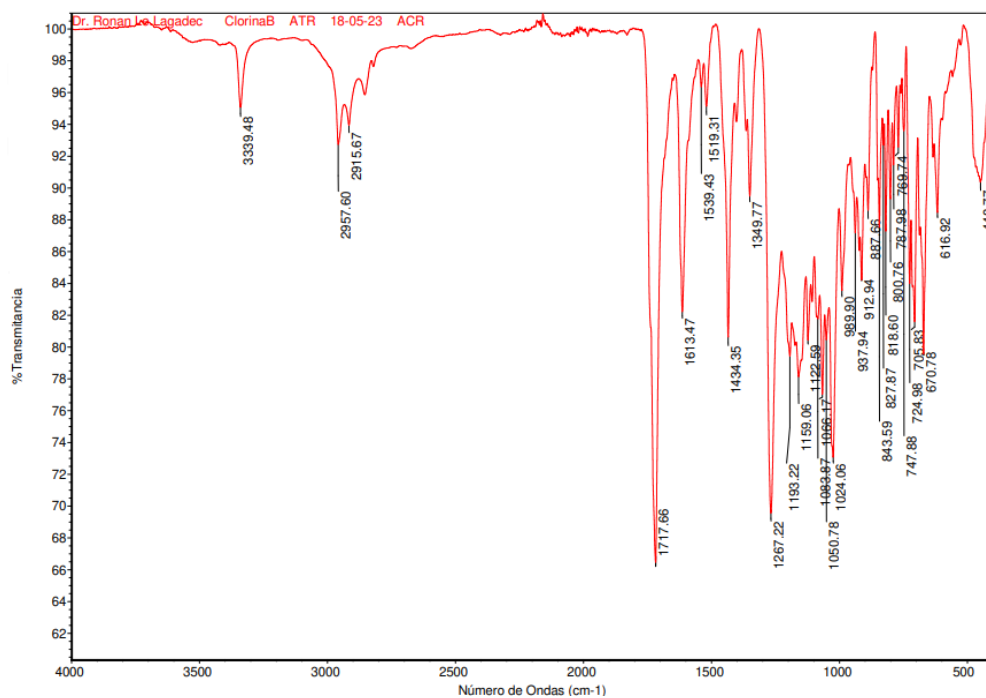
Anexo 14. Espectro RMN-¹H de dMeCloB en CDCl₃, 300 MHz.



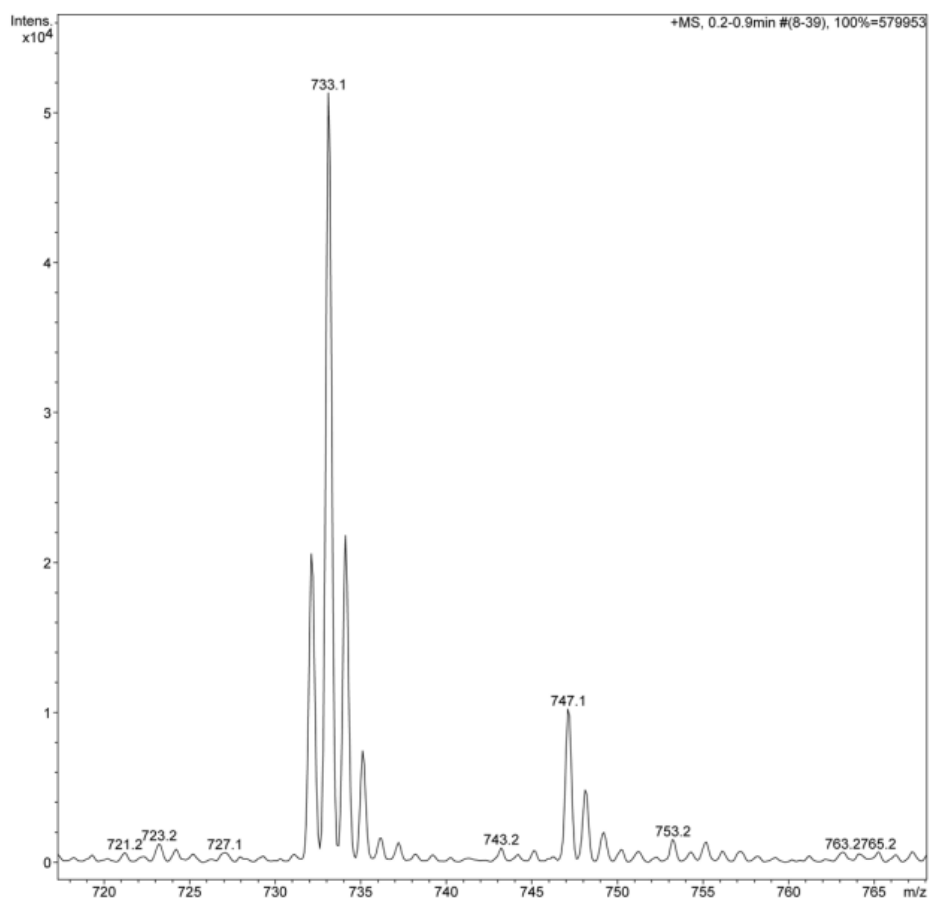
Anexo 15. Espectro RMN-¹³C de dMeCloB en CDCl₃, 75 MHz.



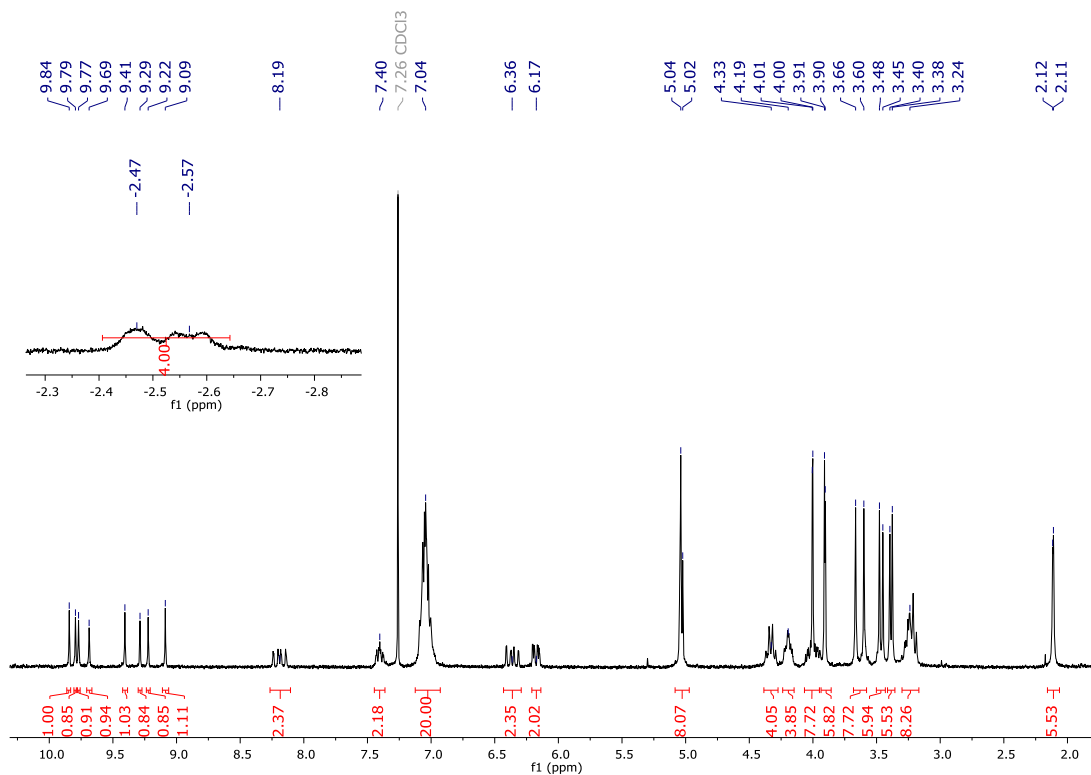
Anexo 16. Espectro FT-IR de dMeCloB.



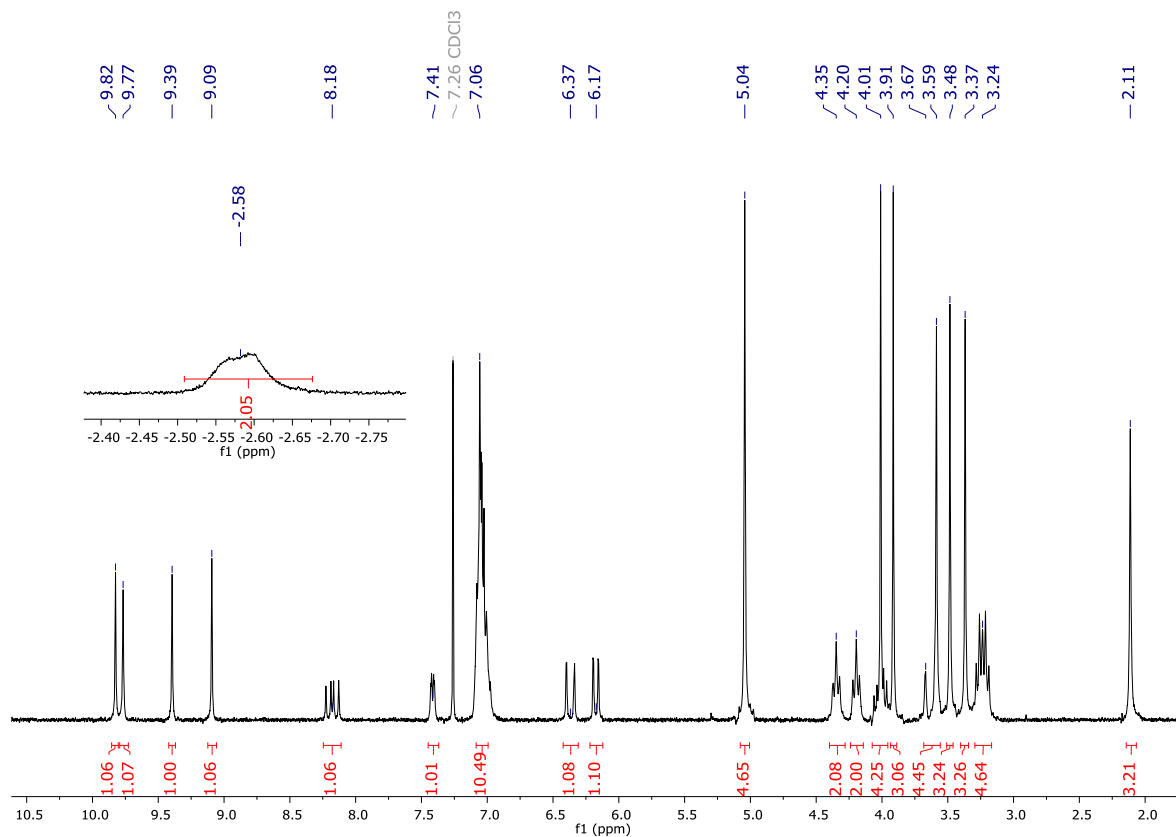
Anexo 17. Espectro MS-ESI de dMeCloB.



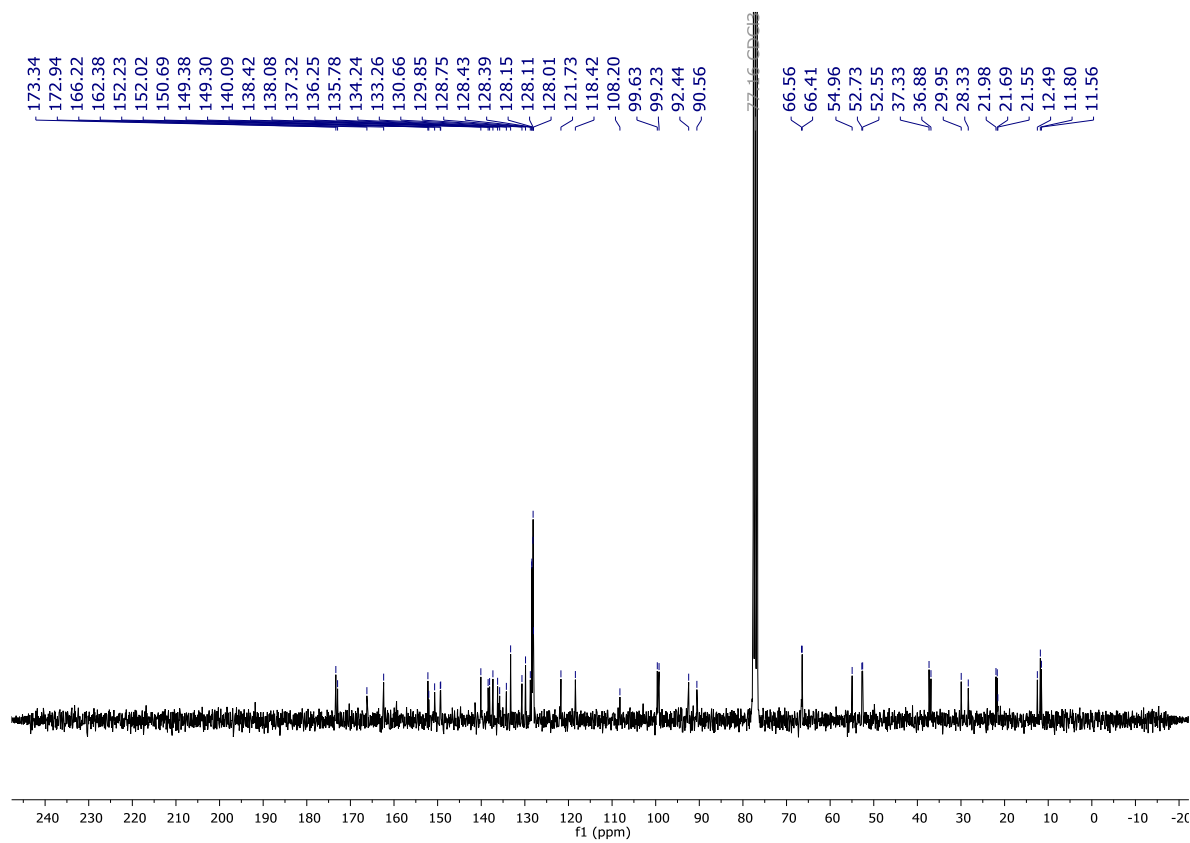
Anexo 18. Espectro RMN-¹H de dBnCloAB en CDCl₃, 300 MHz.



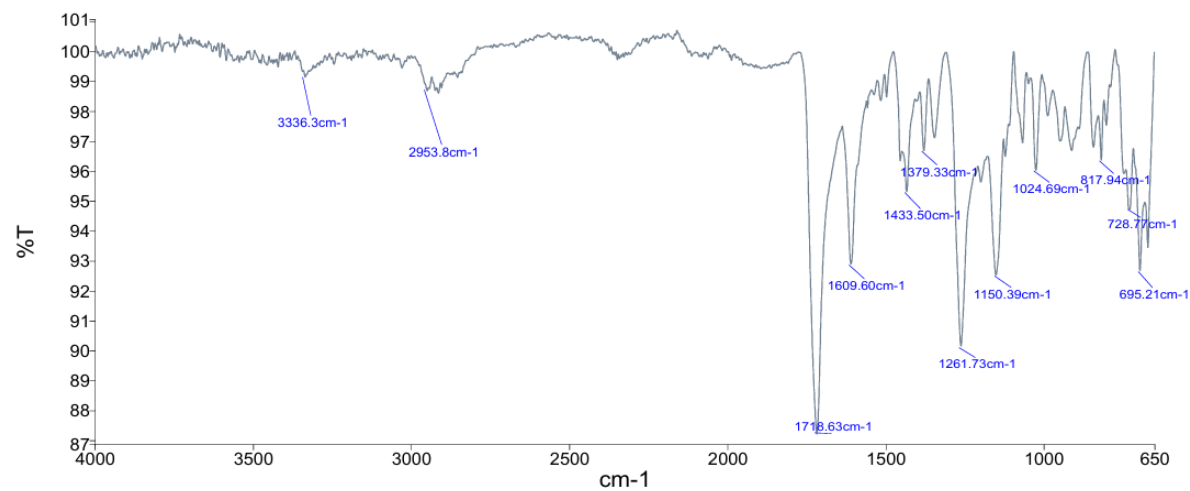
Anexo 19. Espectro RMN-¹H de dBnCloA en CDCl₃, 300 MHz.



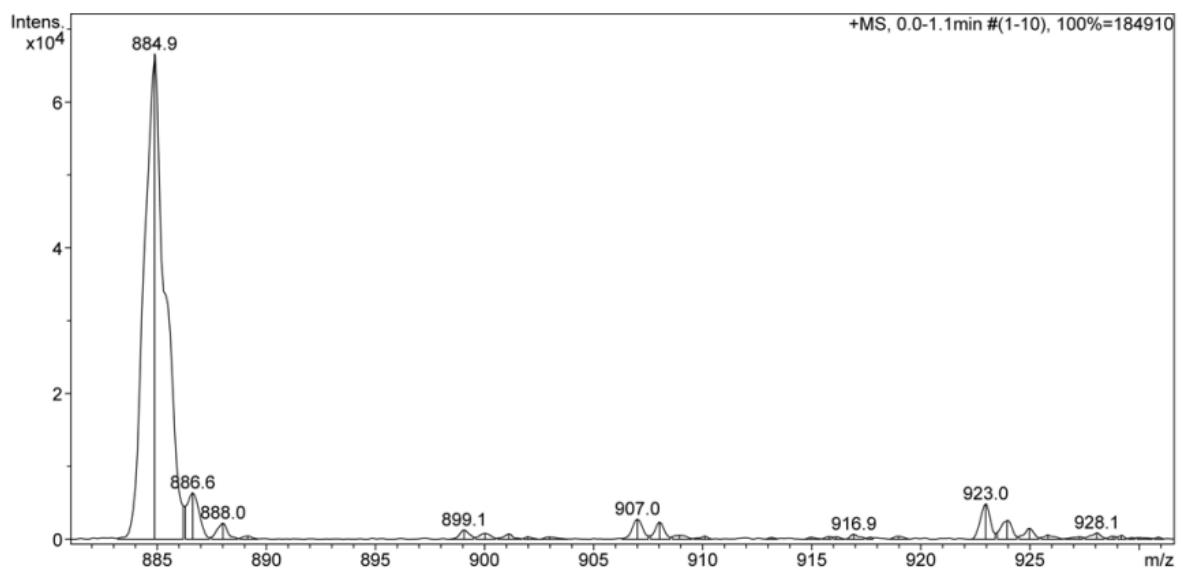
Anexo 20. Espectro RMN-¹³C de dBnCloA en CDCl₃, 75 MHz.



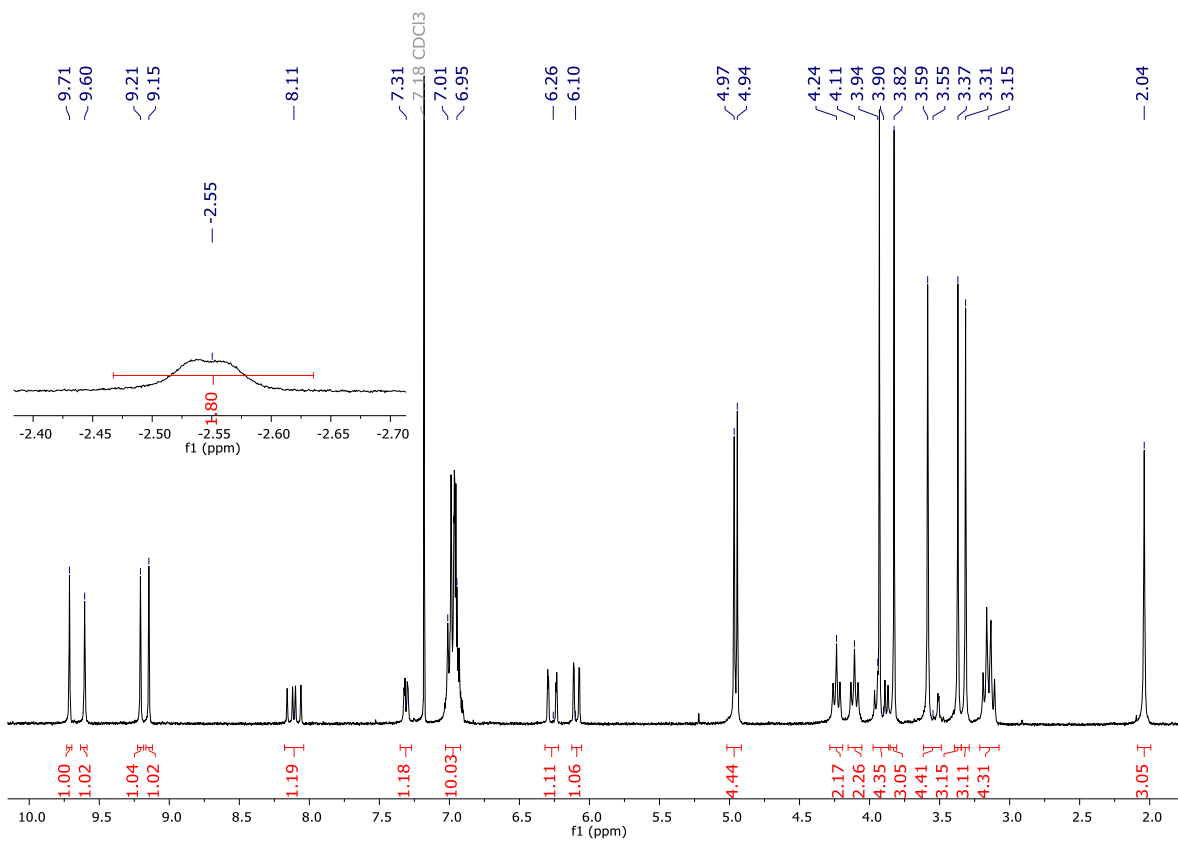
Anexo 21. Espectro FT-IR de dMeCloA.



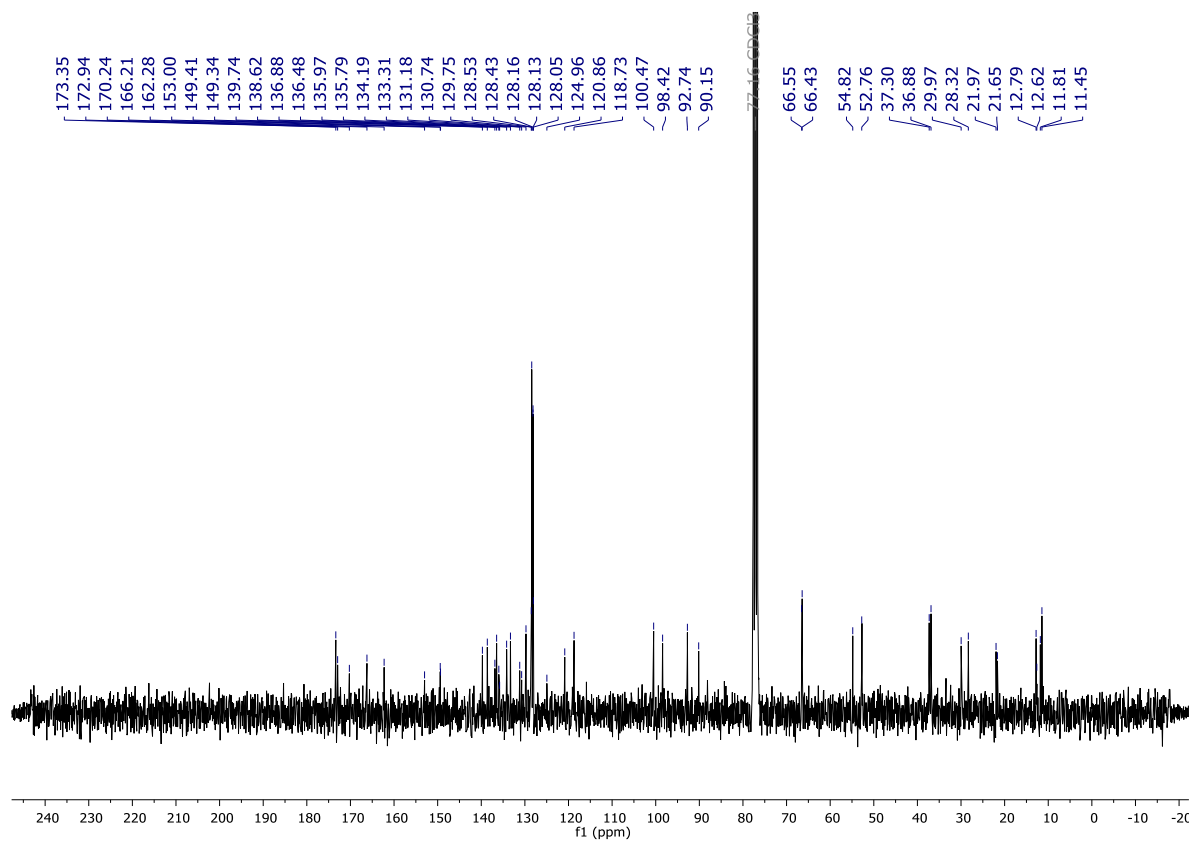
Anexo 22. Espectro MS-ESI de **dBnCloA**.



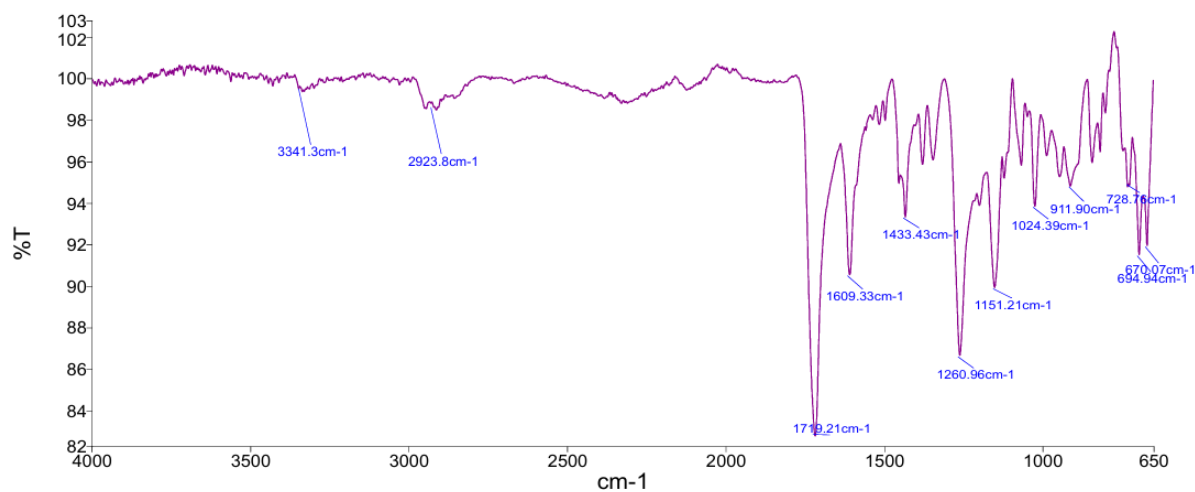
Anexo 23. Espectro RMN- ^1H de **dBnCloB** en CDCl_3 , 300 MHz.



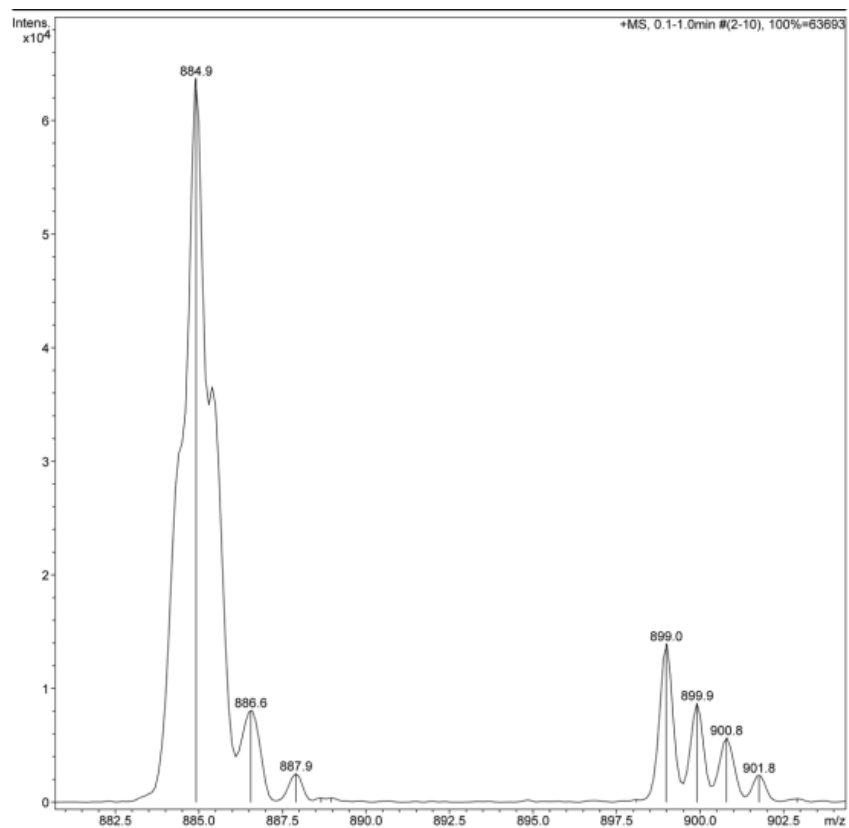
Anexo 24. Espectro RMN-¹³C de dBnCloB en CDCl₃, 75 MHz.



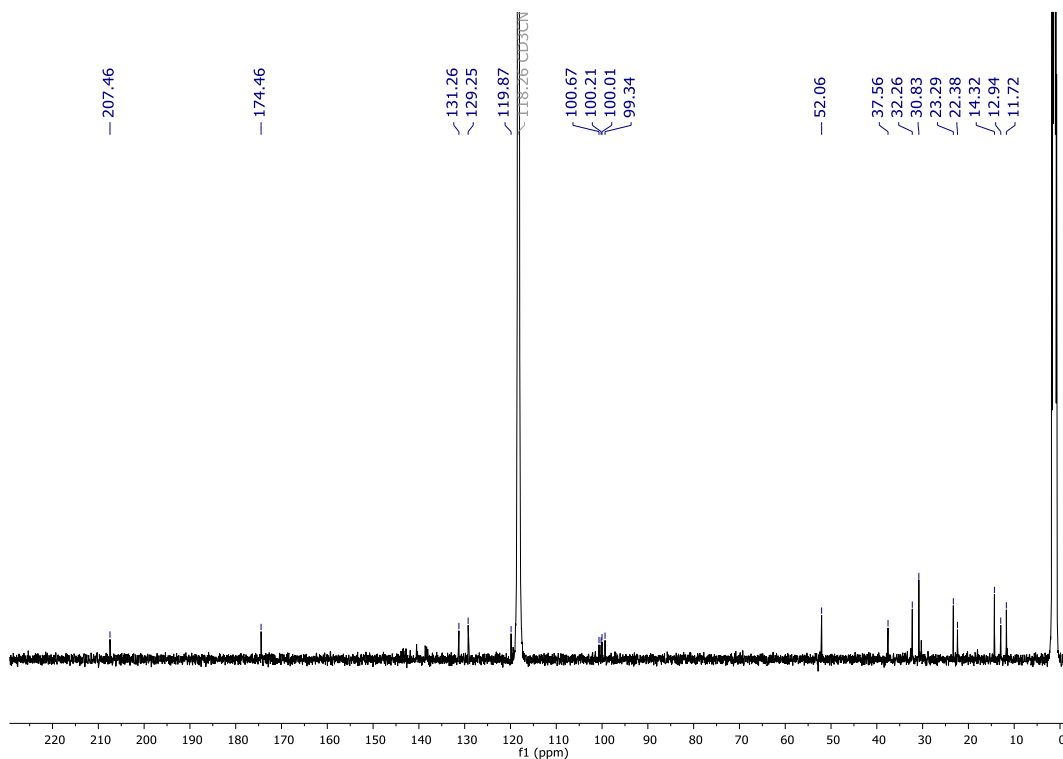
Anexo 25. Espectro FT-IR de dMeCloB.



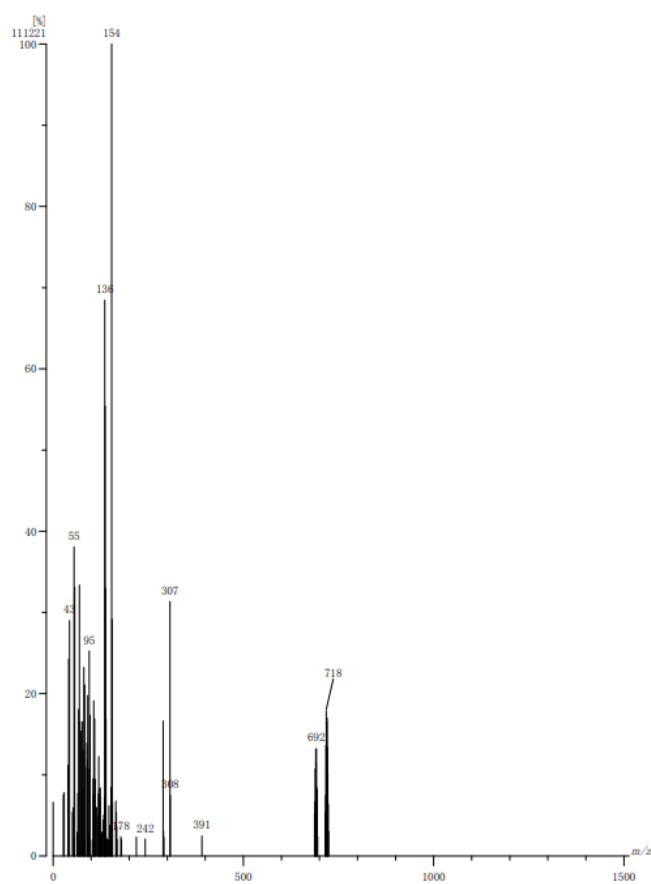
Anexo 26. Espectro MS-ESI de **dBnCloB**.



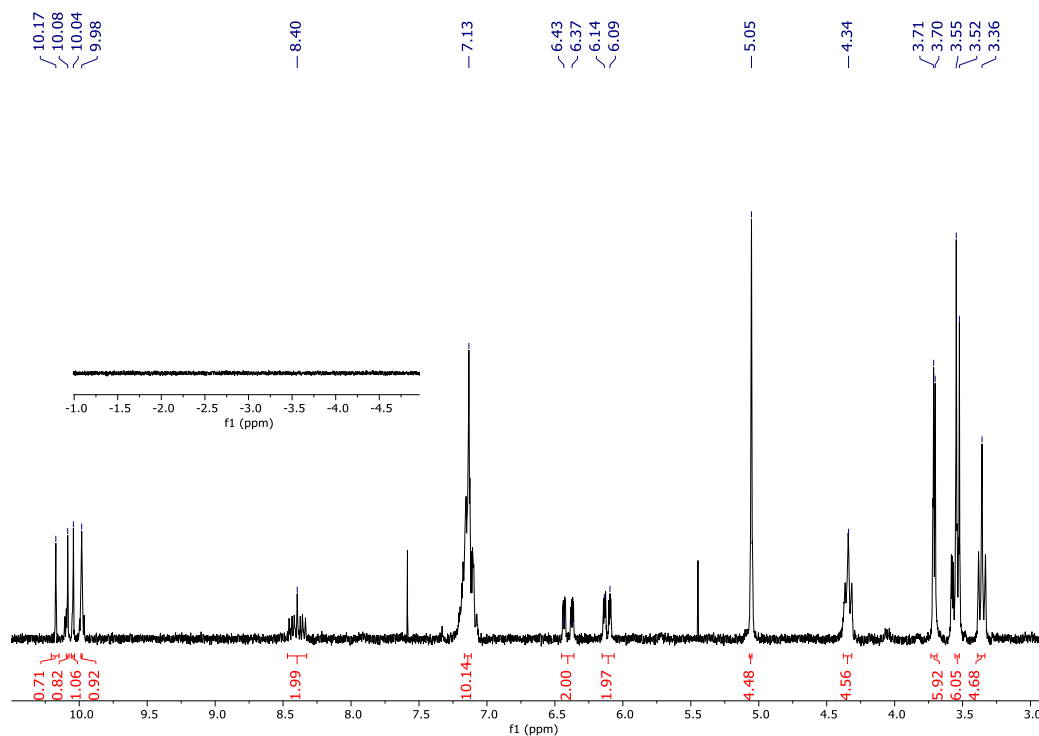
Anexo 27. Espectro RMN- ^{13}C de **[Ru(dMePpIX)CO]** en CD_3CN , 125 MHz.



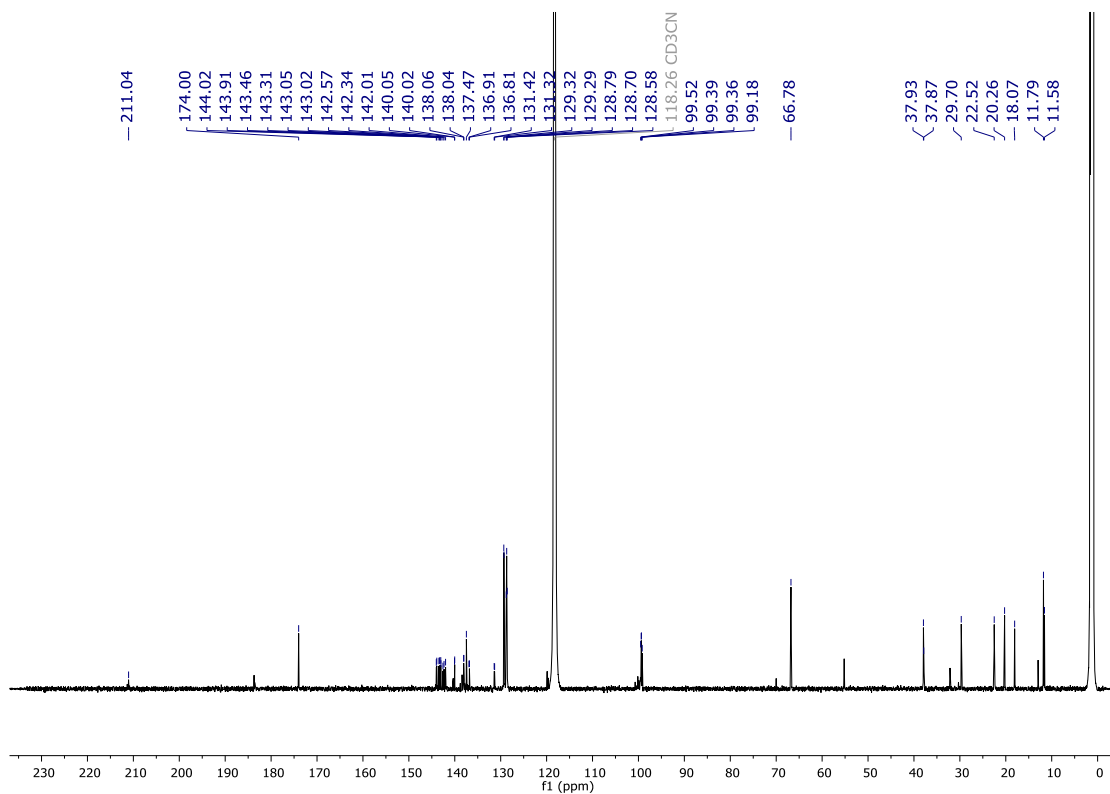
Anexo 28. Espectro MS-FAB⁺ de [Ru(dMePpIX)CO].



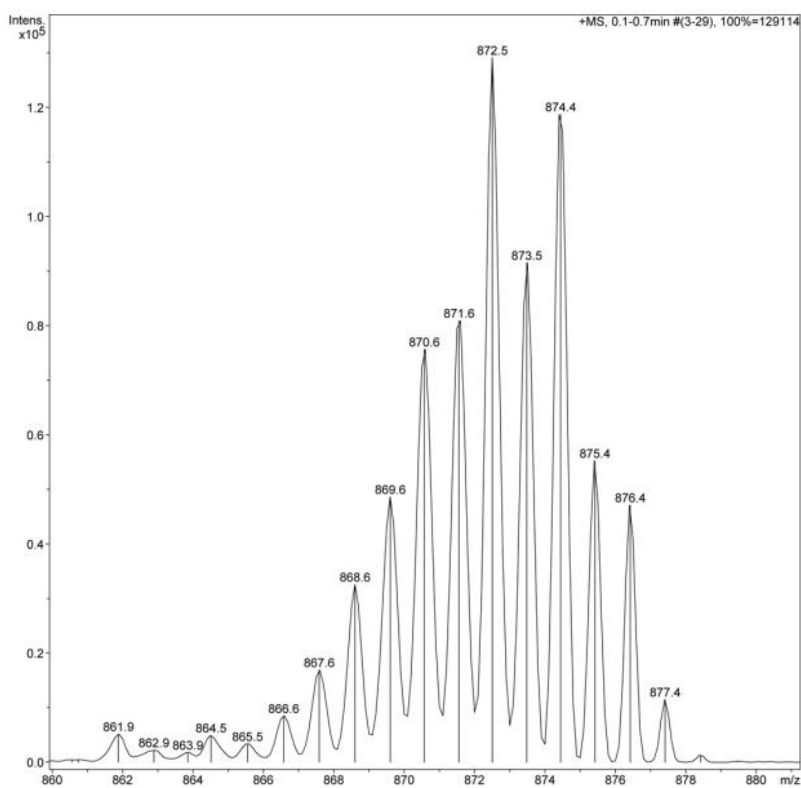
Anexo 29. Espectro RMN-¹H de [Ru(dBnPpIX)CO] en CD₃CN, 500 MHz.



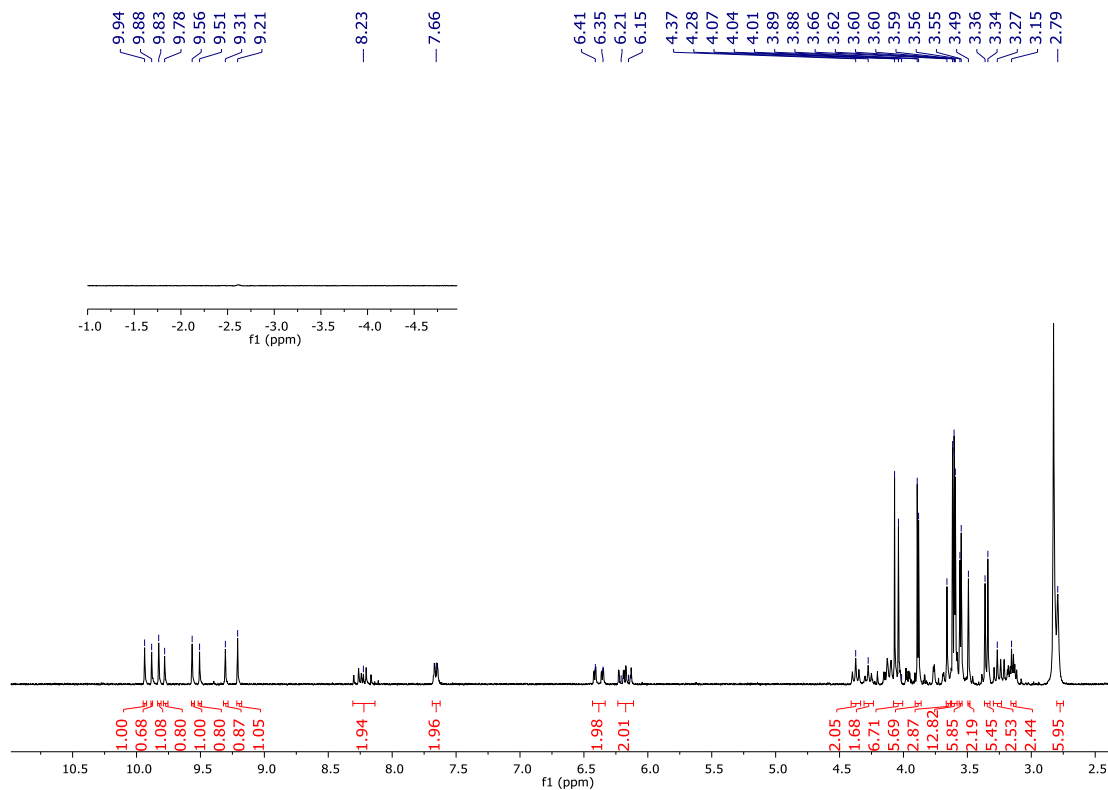
Anexo 30. Espectro RMN- ^{13}C de $[\text{Ru}(\text{dBnPPiX})\text{CO}]$ en CD_3CN , 125 MHz.



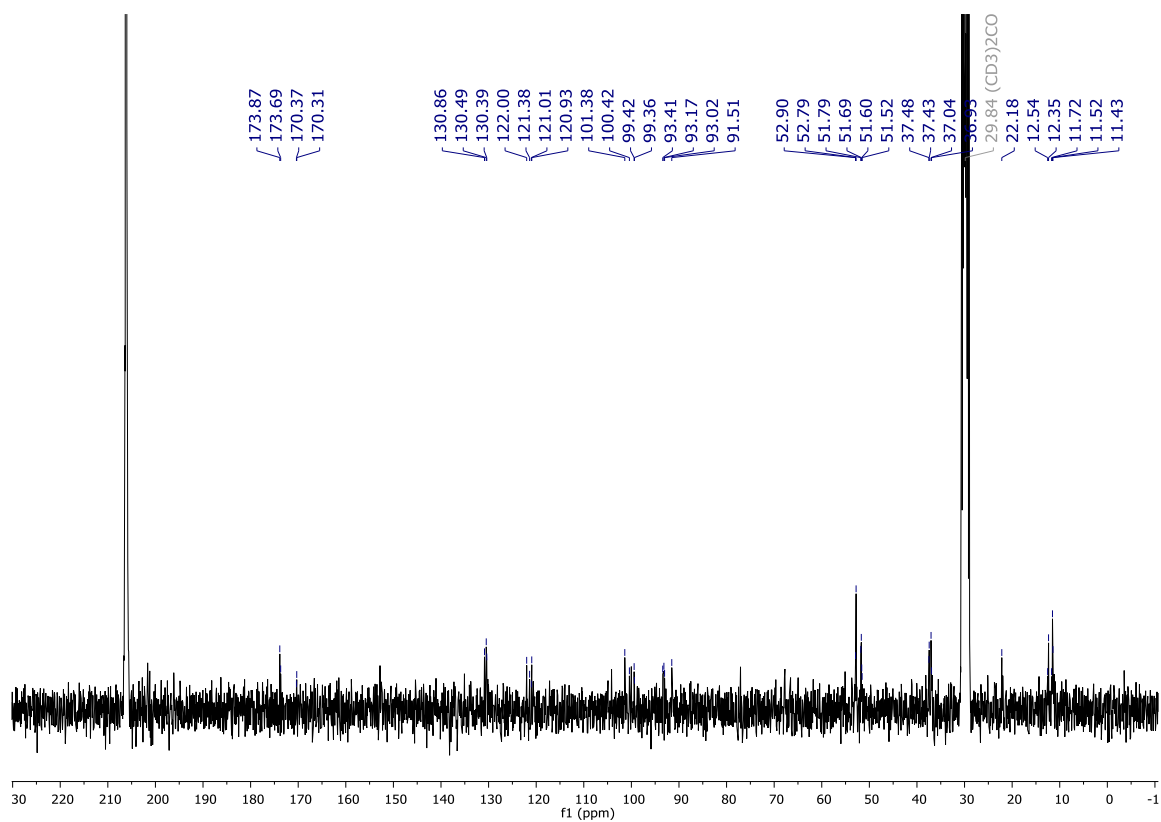
Anexo 31. Espectro MS-ESI de $[\text{Ru}(\text{dBnPPiX})\text{CO}]$.



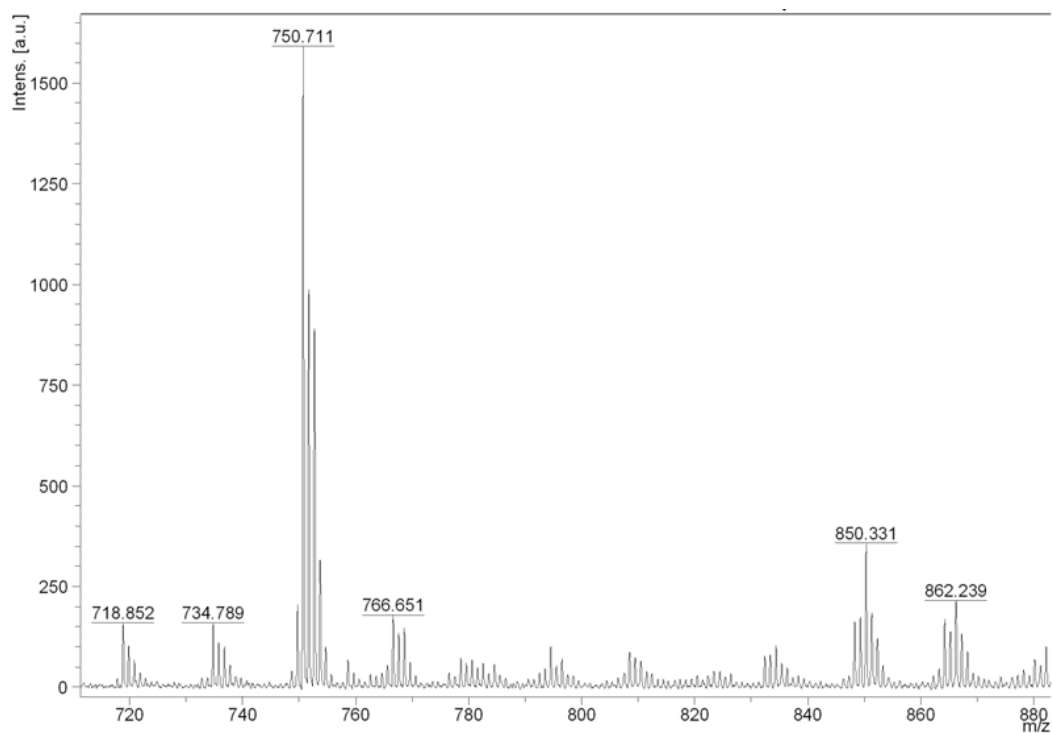
Anexo 32. Espectro RMN-¹H de [Ru(dMeCloAB)CO] en acetona-*d*₆, 300 MHz.



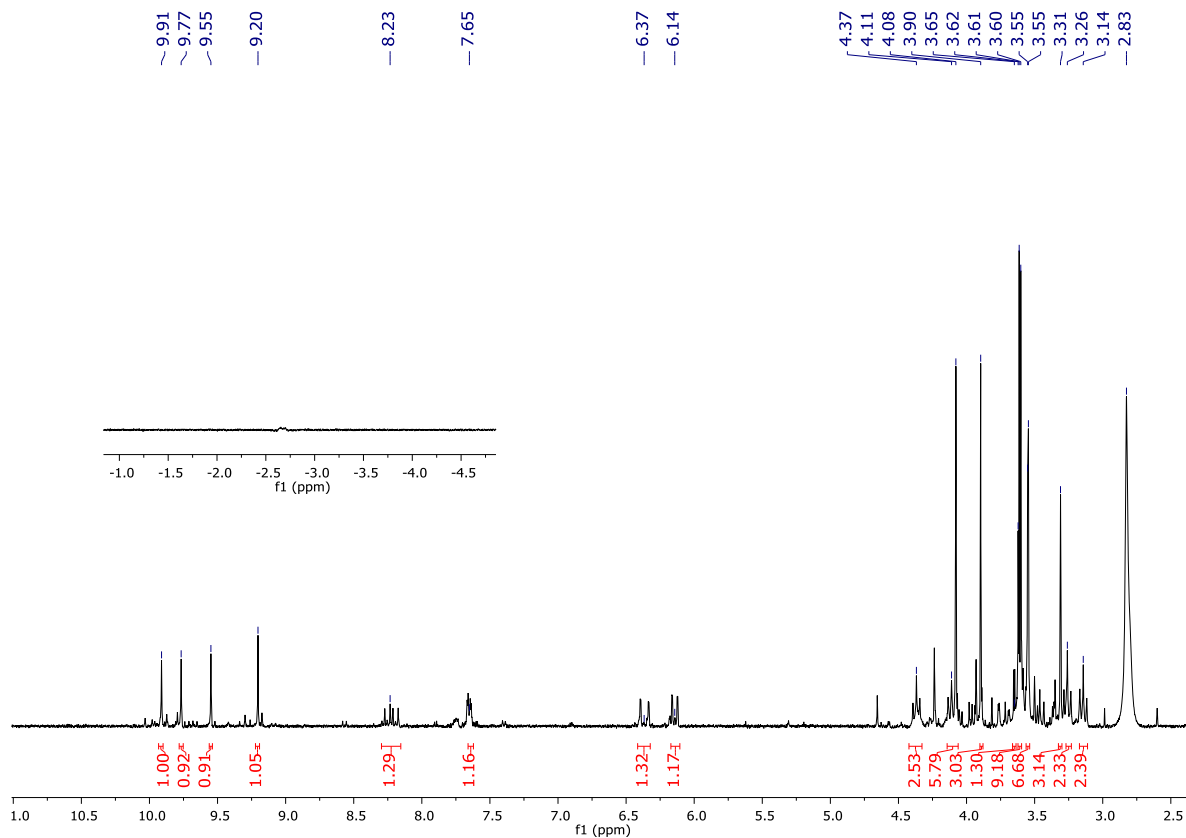
Anexo 33. Espectro RMN-¹³C de [Ru(dMeCloAB)CO] en acetona-*d*₆, 75 MHz.



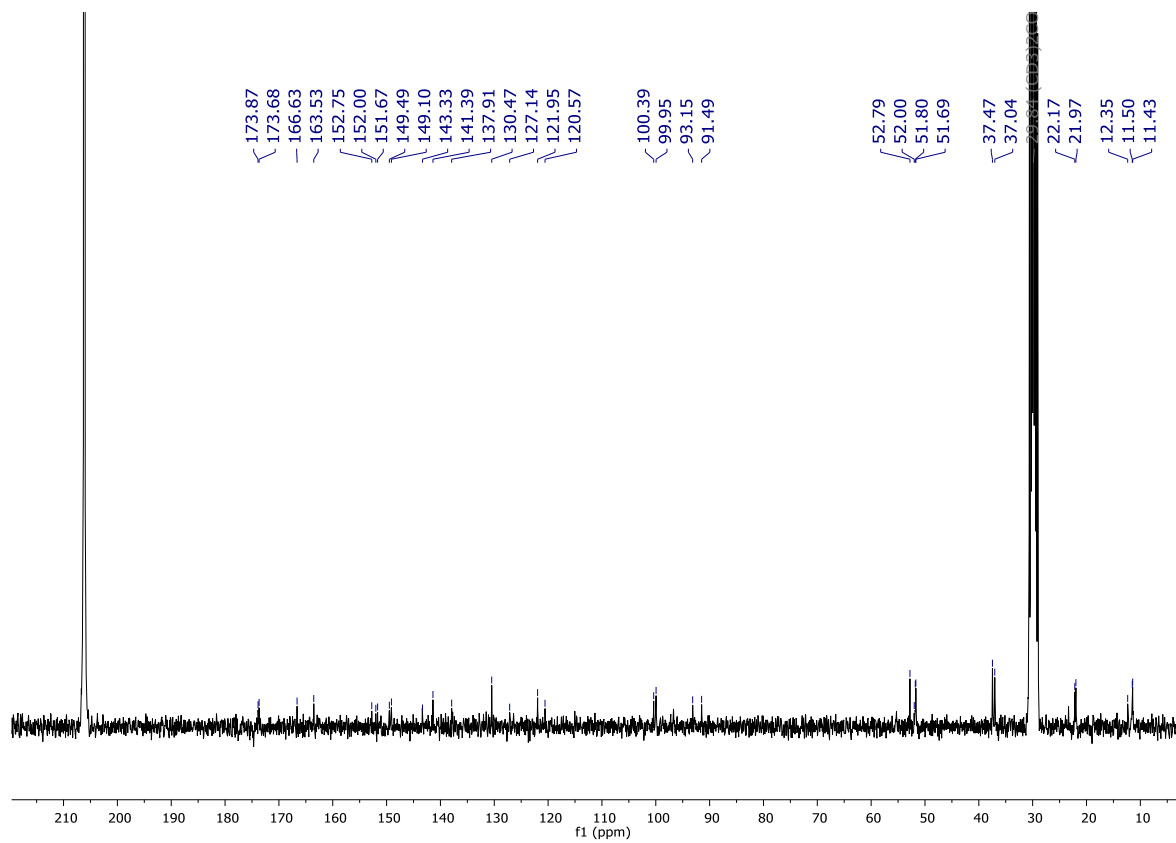
Anexo 34. Espectro MS-ESI de [Ru(dMeCloAB)CO].



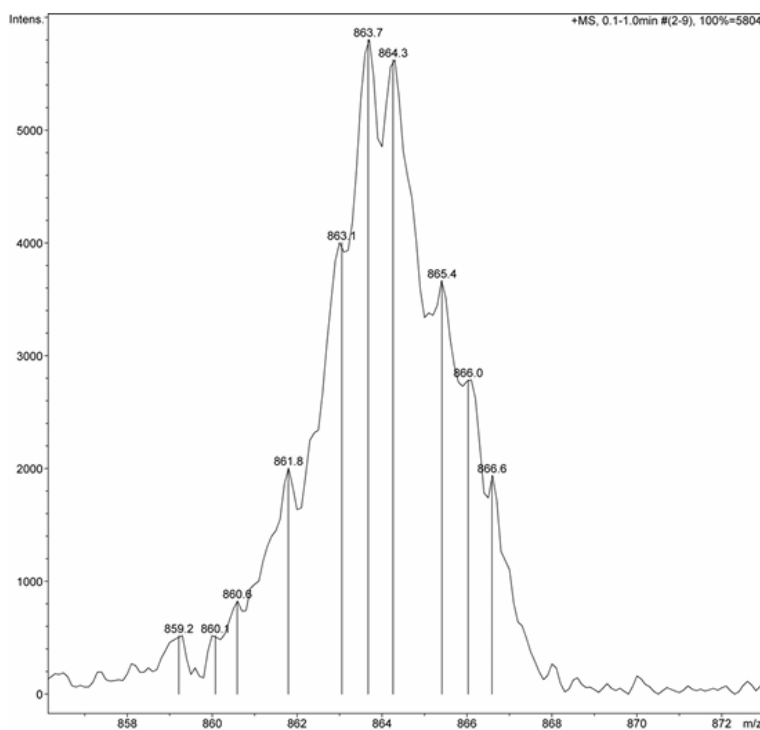
Anexo 35. Espectro RMN-¹H de [Ru(dMeCloA)CO] en acetona-d₆, 300 MHz.



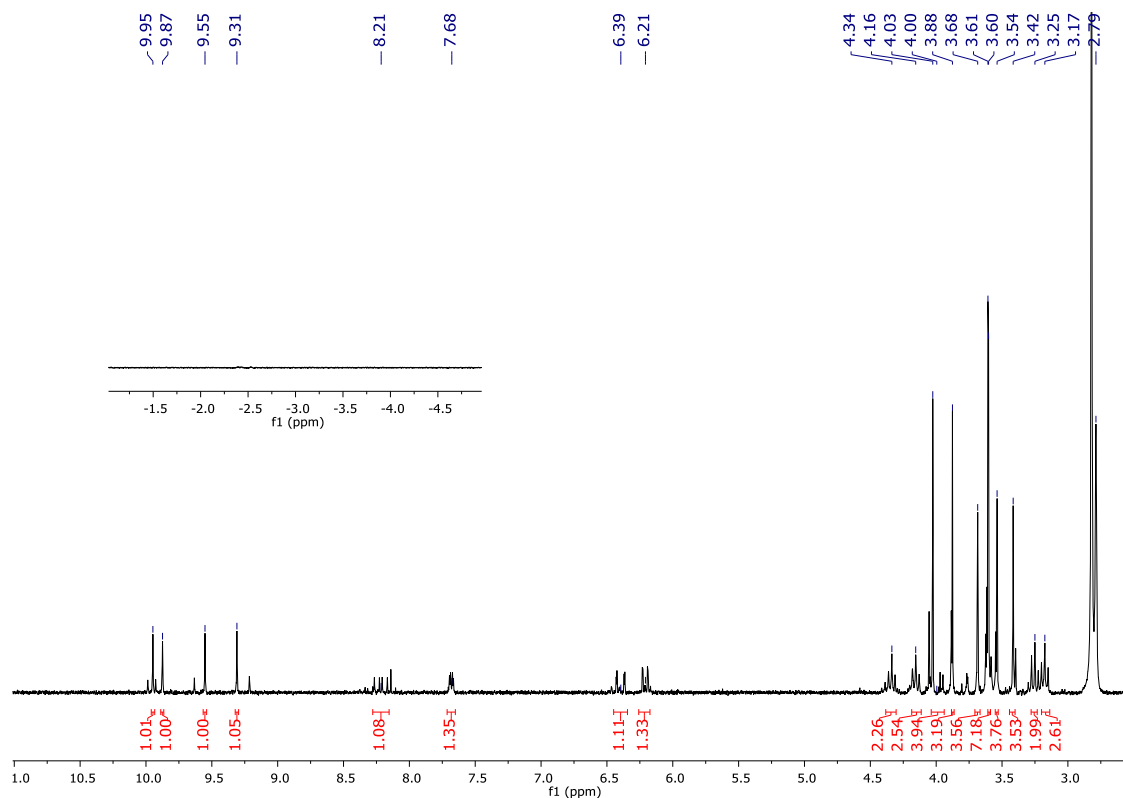
Anexo 36. Espectro RMN- ^{13}C de $[\text{Ru}(\text{dMeCloA})\text{CO}]$ en acetona- d_6 , 75 MHz.



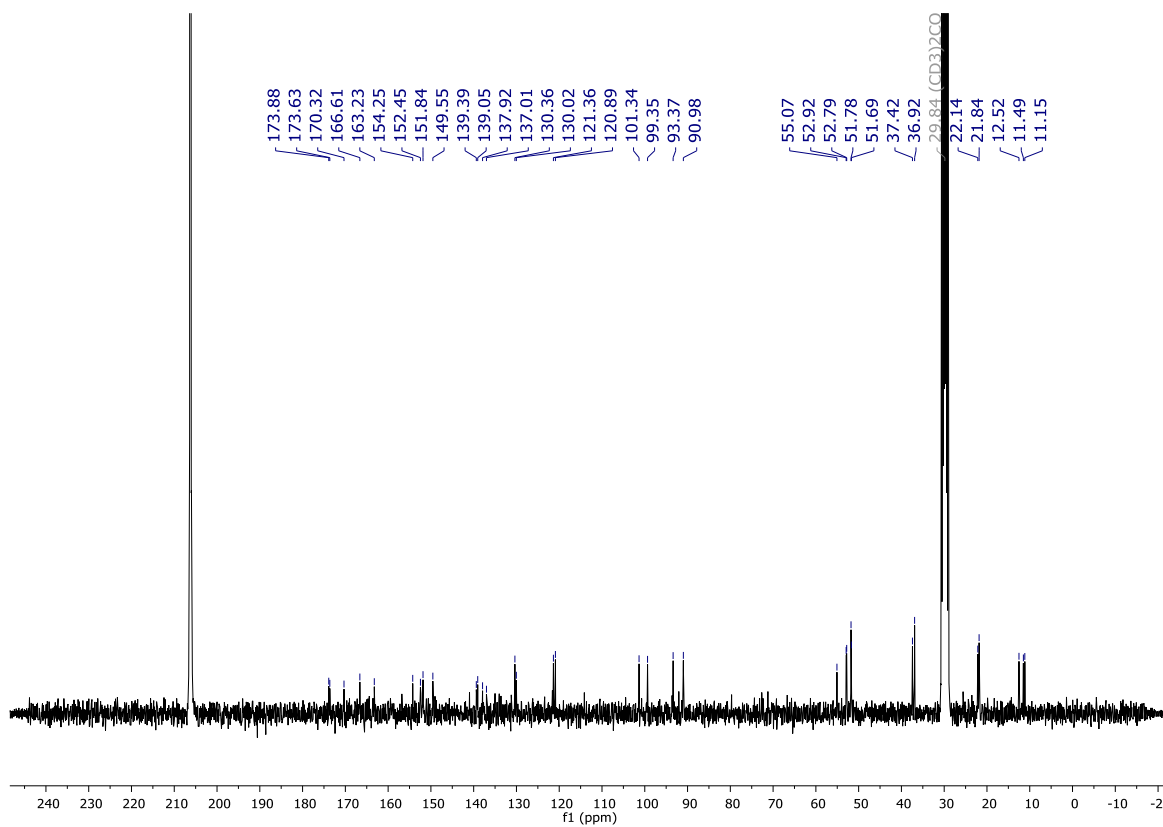
Anexo 37. Espectro MS-ESI de $[\text{Ru}(\text{dMeCloA})\text{CO}]$.



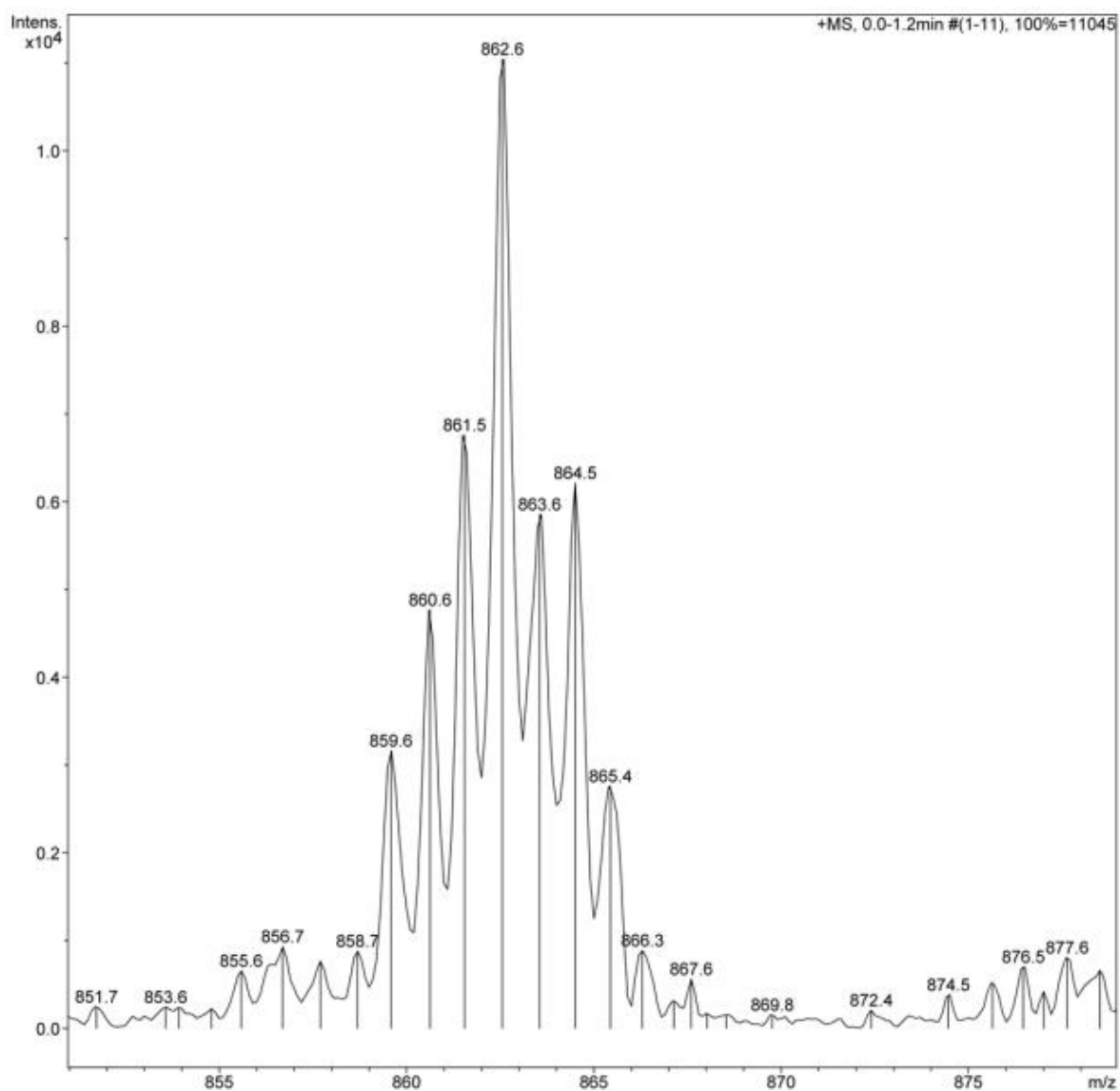
Anexo 38. Espectro RMN- ^1H de $[\text{Ru}(\text{dMeCloB})\text{CO}]$ en acetona- d_6 , 300 MHz.



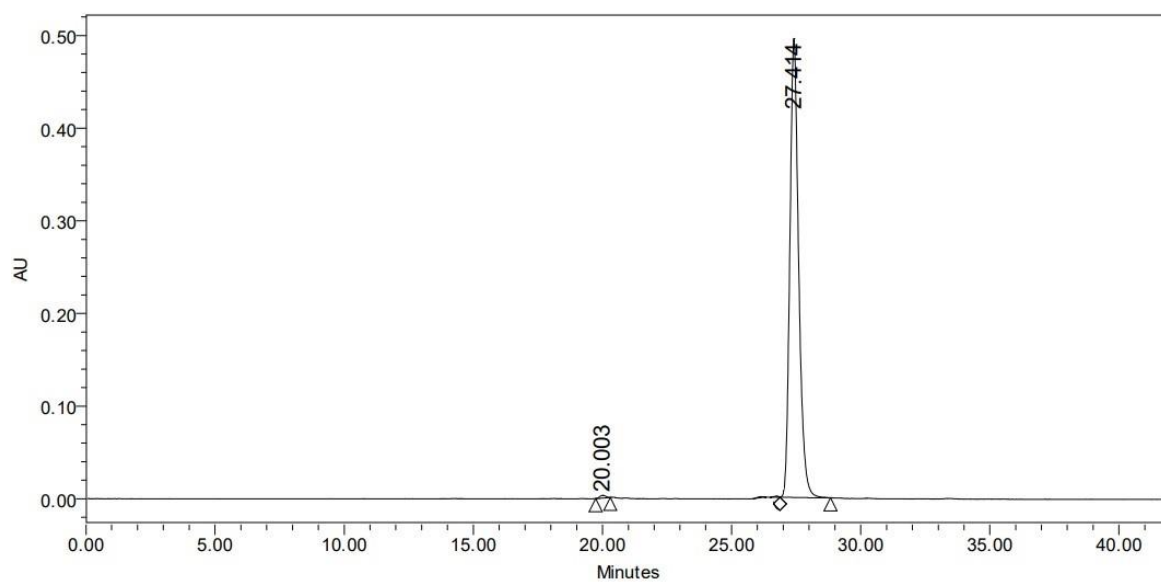
Anexo 39. Espectro RMN- ^{13}C de $[\text{Ru}(\text{dMeCloB})\text{CO}]$ en acetona- d_6 , 75 MHz.



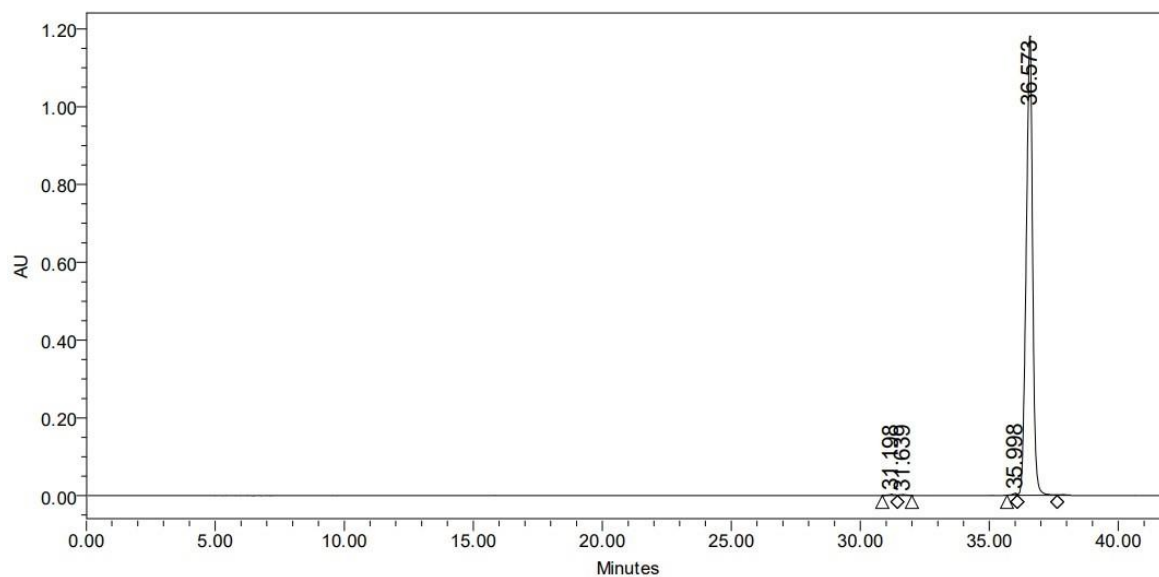
Anexo 40. Espectro MS-ESI de [Ru(dMeCloB)CO].



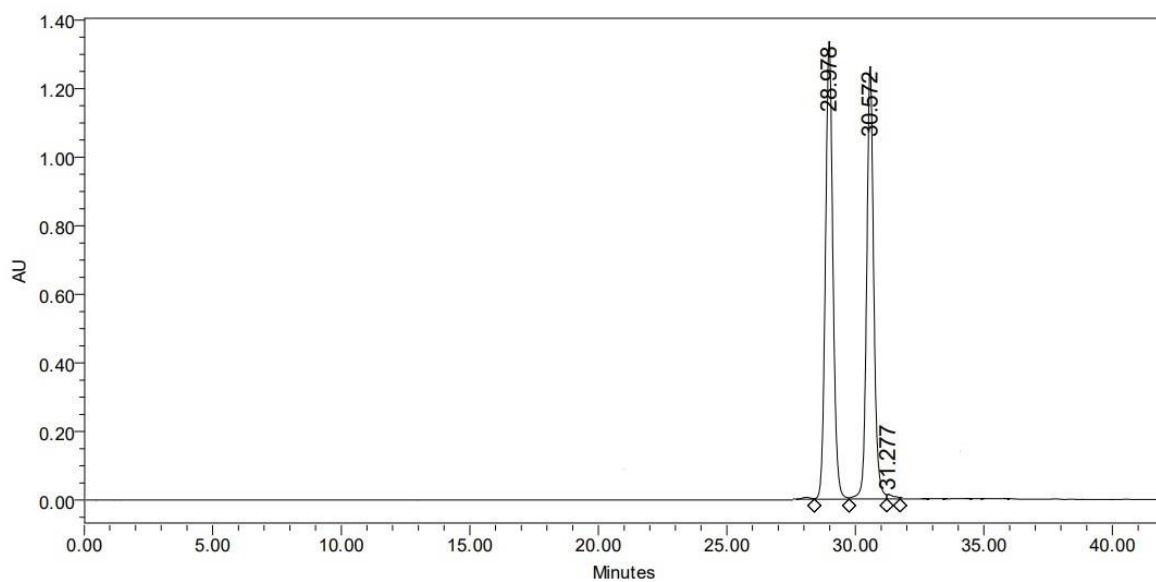
Anexo 41. HPLC de dMePpIX. Detección a 406 nm.



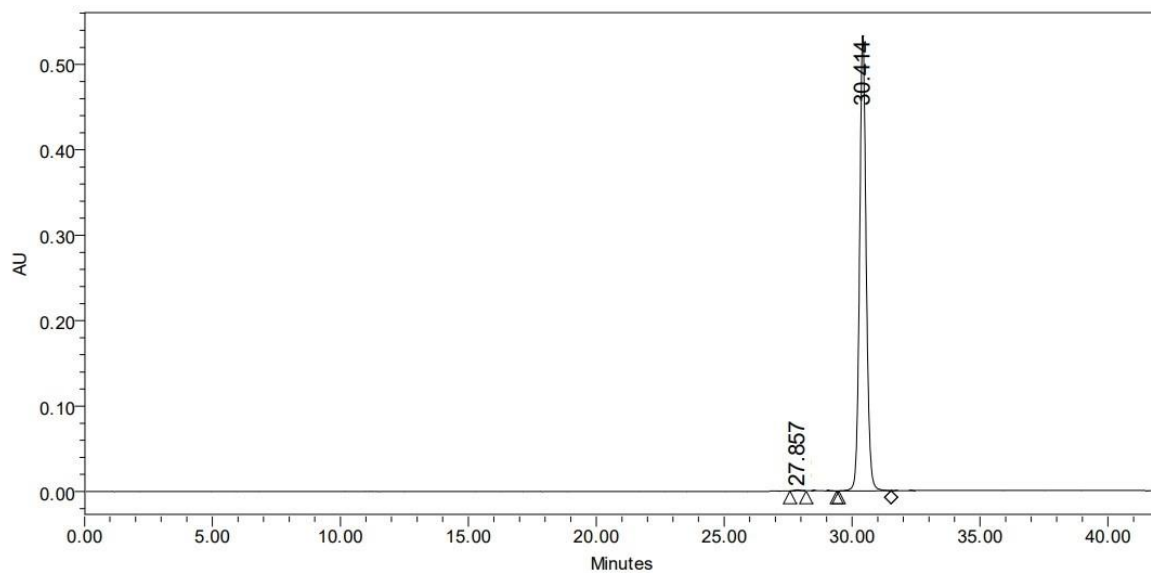
Anexo 42. HPLC de dBnPpIX. Detección a 408 nm.



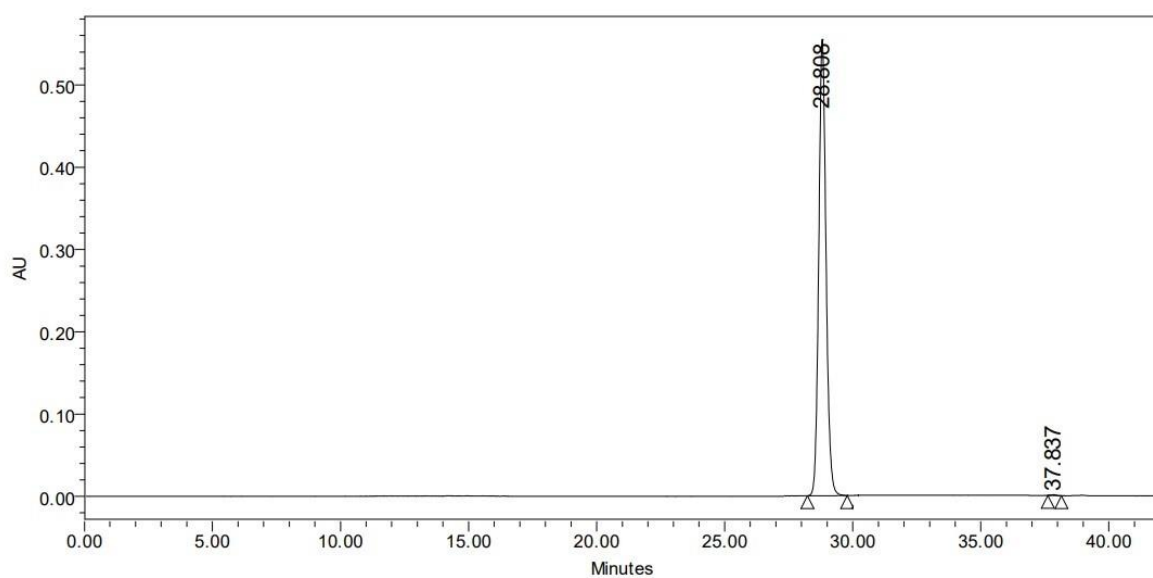
Anexo 43. HPLC de **dBnCloAB**. Detección a 406 nm.



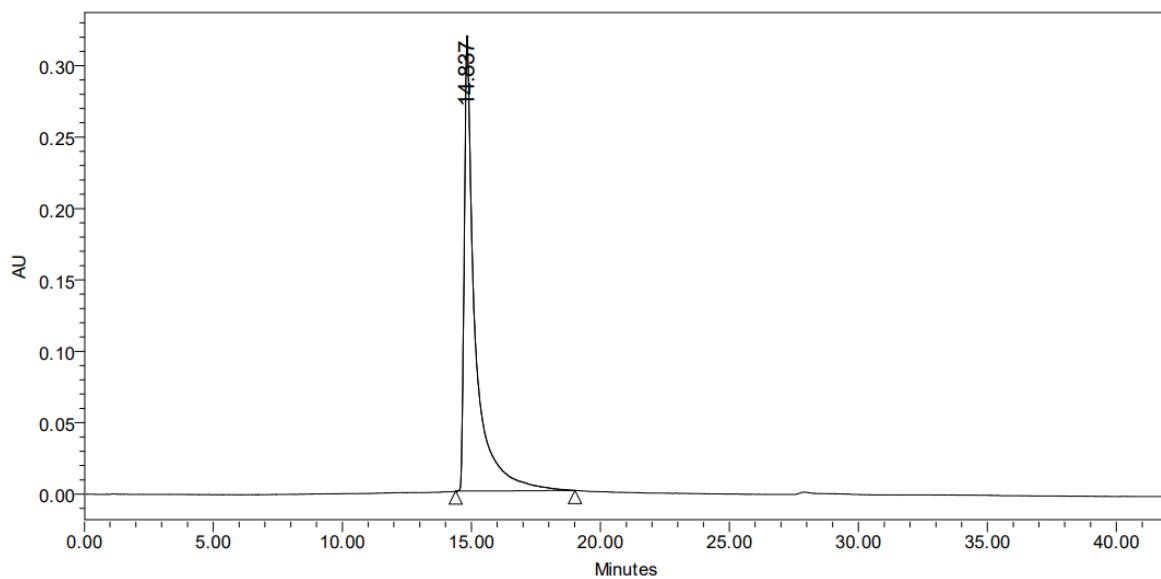
Anexo 44. HPLC de **dBnCloA**. Detección a 406 nm.



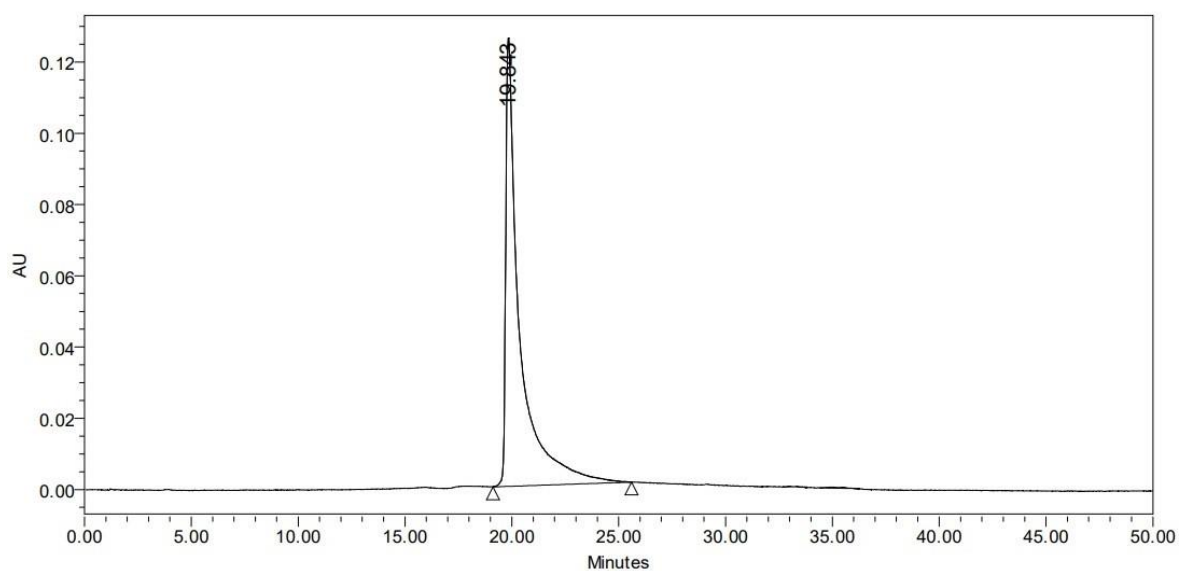
Anexo 45. HPLC de **dBnCloB**. Detección a 408 nm.



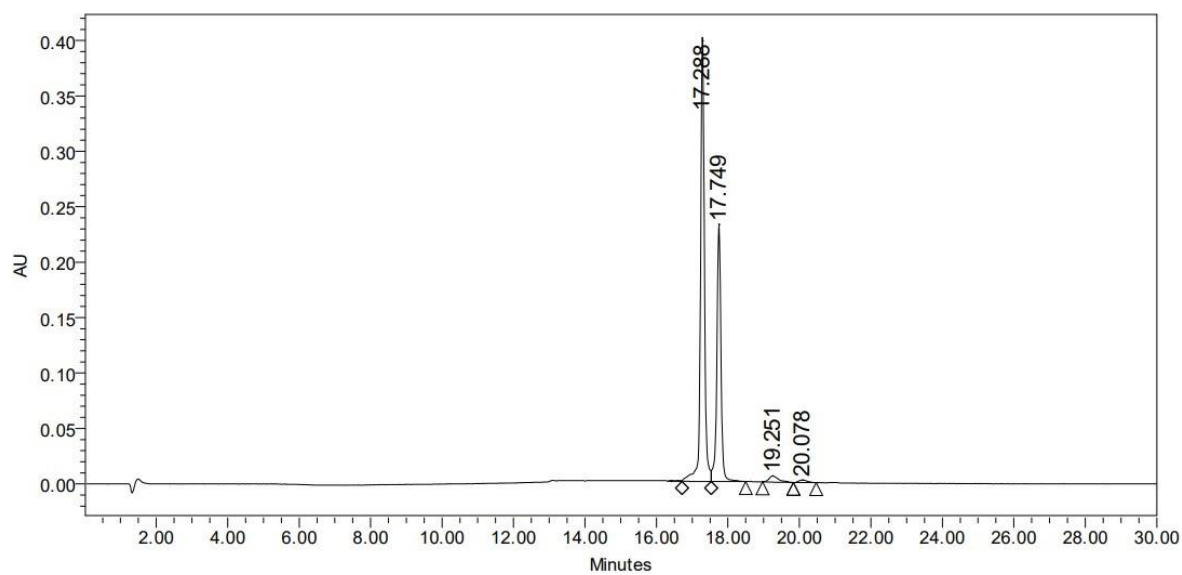
Anexo 46. HPLC de **[Ru(dMePpIX)CO]**. Detección a 404 nm.



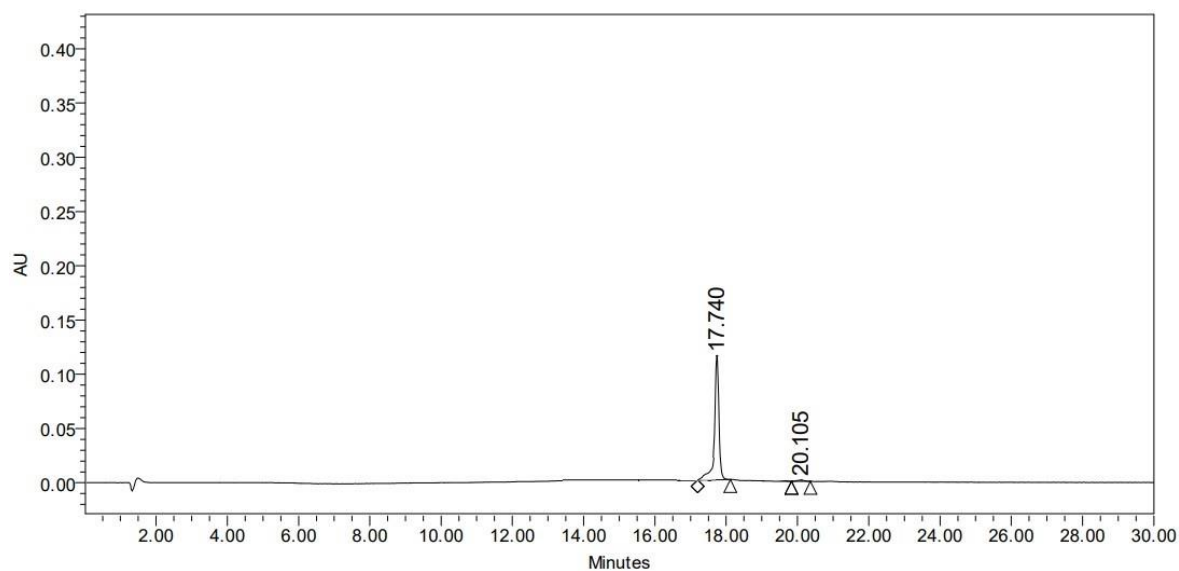
Anexo 47. HPLC de [Ru(dBnPpIX)CO]. Detección a 402 nm.



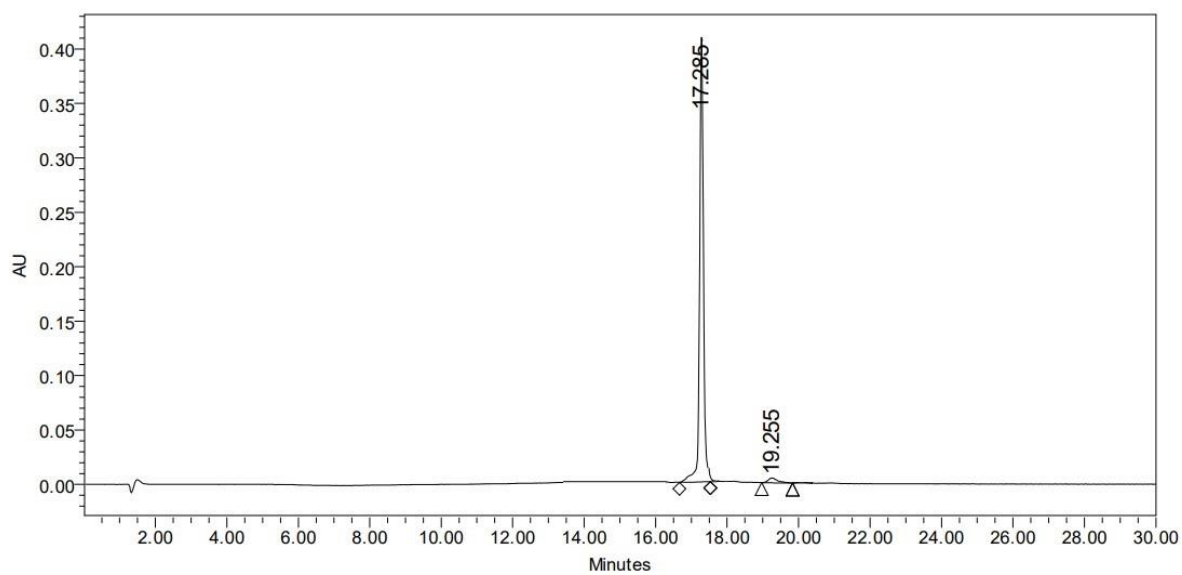
Anexo 48. HPLC de [Ru(dMeCloAB)CO]. Detección a 402 nm.



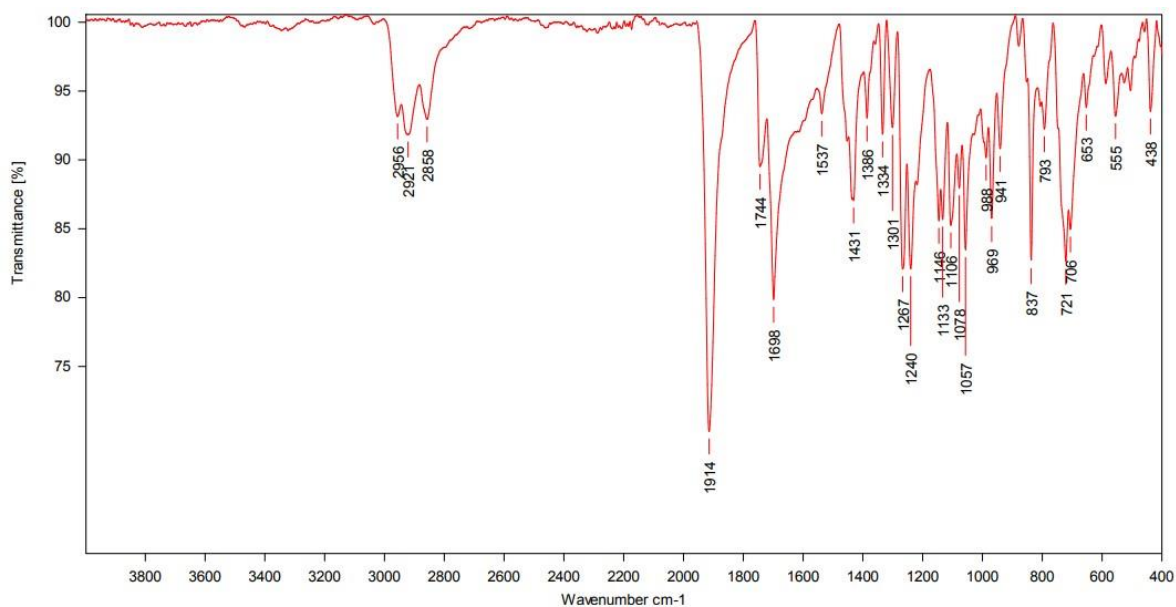
Anexo 49. HPLC de $[\text{Ru}(\text{dMeCloA})\text{CO}]$. Detección a 408 nm.



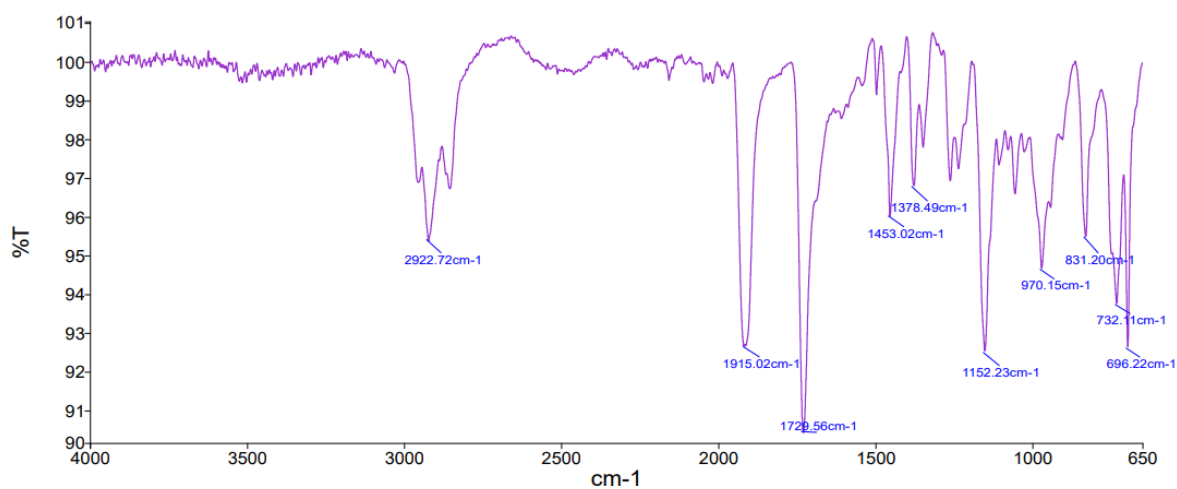
Anexo 50. HPLC de $[\text{Ru}(\text{dMeCloB})\text{CO}]$. Detección a 402 nm.



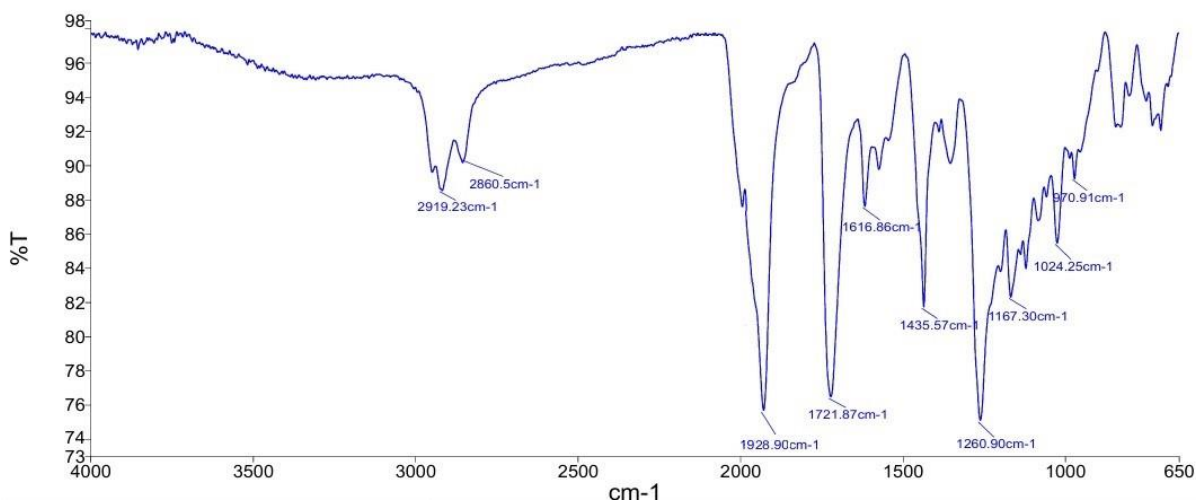
Anexo 51. FT-IR de [Ru(dMePpIX)CO].



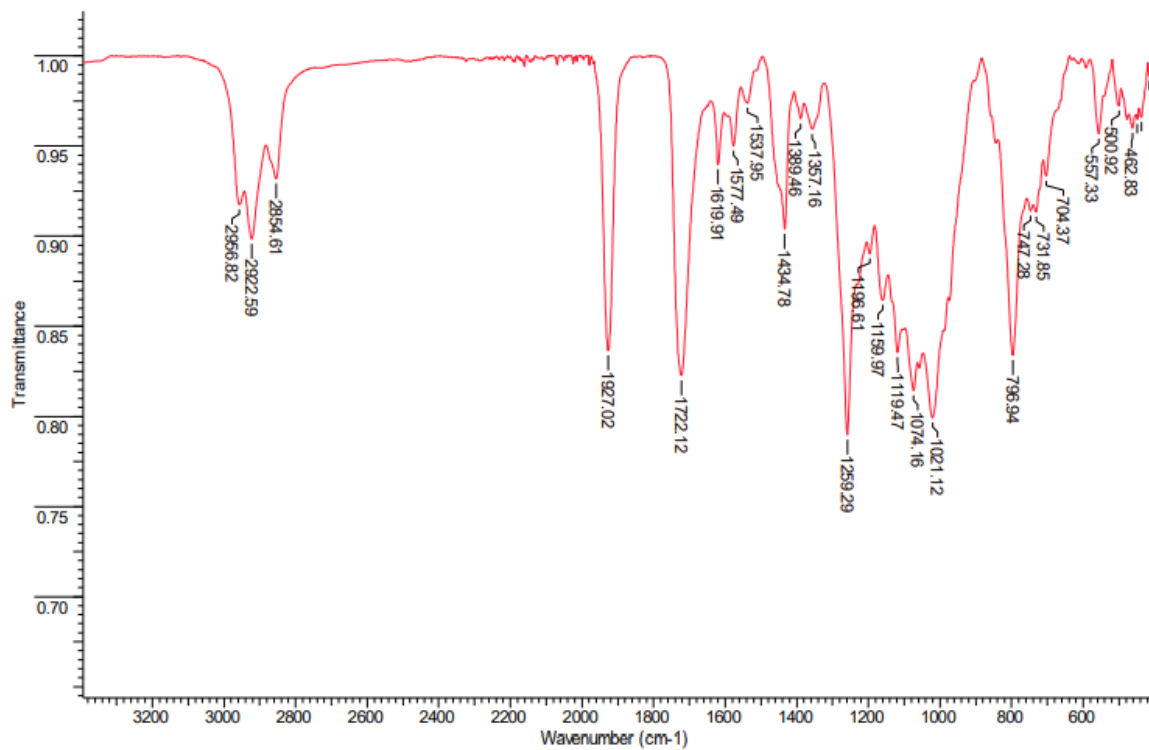
Anexo 52. FT-IR de [Ru(dBnPpIX)CO].



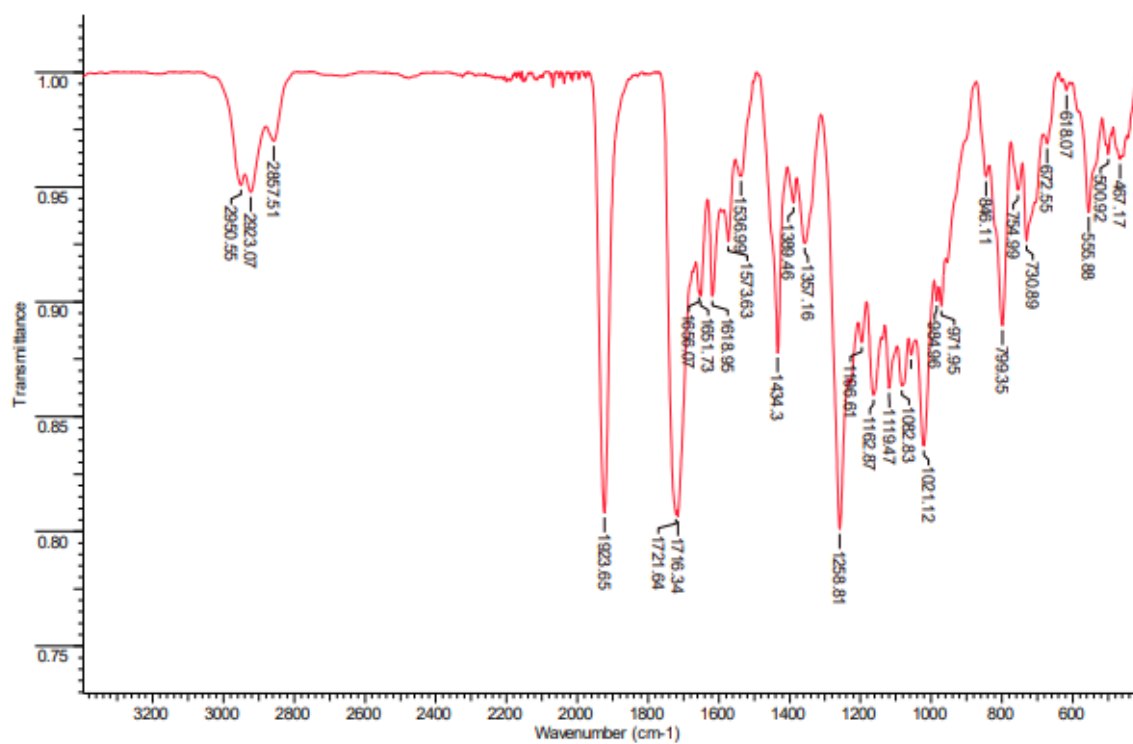
Anexo 53. FT-IR de [Ru(dMeCloAB)CO].



Anexo 54. FT-IR de [Ru(dMeCloA)CO].



Anexo 55. FT-IR de [Ru(dMeCloB)CO].



Protoporphyrin IX-Derived Ruthenium(II) Complexes for Photodynamic Therapy in Gastric Cancer Cells

Andrés Restrepo-Acevedo, María Isabel Murillo, Christophe Orvain, Chloé Thibaudeau, Sevda Recberlik, Lucas Verget, Virginia Gómez Vidales, Christian Gaidon, Georg Mellitzer,* and Ronan Le Lagadec*



Cite This: <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5c00896>



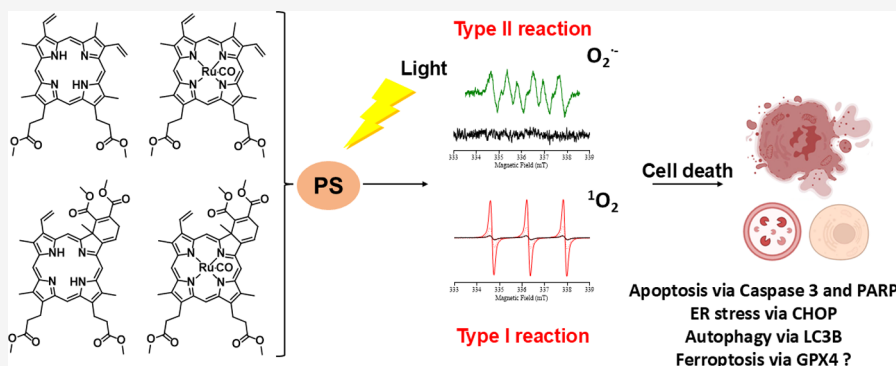
Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information



ABSTRACT: In recent years, photodynamic therapy (PDT) has emerged as a promising alternative to classical chemotherapy for treating cancer. PDT is based on a nontoxic prodrug called photosensitizer (PS) activated by light at the desired location. Upon irradiation, the PS reacts with the oxygen present in the tumor, producing cytotoxic reactive oxygen species (ROS). Compounds with highly conjugated π -bond systems, such as porphyrins and chlorins, have proven to be excellent light scavengers, and introducing a metal atom in their structure improved the generation of ROS. In this work, a series of tetrapyrrole-ruthenium(II) complexes derived from protoporphyrin IX and the commercial drug verteporfin were designed as photosensitizers for PDT. The complexes were almost nontoxic on human gastric cancer cells under dark conditions, revealing remarkable cytotoxicity upon irradiation with light. The ruthenium atom in the central cavity of the chlorin ligand allowed combined mechanisms in photodynamic therapy, as both singlet oxygen and superoxide radicals were detected. Additionally, one complex produced large amounts of singlet oxygen under hypoxic conditions. Biological assays demonstrated that the ruthenium derivatives caused cell death through a caspase 3 mediated apoptotic pathway and *via* CHOP, an endoplasmic reticulum stress-inducible transcription factor involved in apoptosis and growth arrest.

INTRODUCTION

Photodynamic therapy (PDT) is an approved anticancer strategy with high temporal selectivity, which presents several advantages over conventional radiotherapy and chemotherapy, such as few side effects and as a noninvasive therapy.^{1,2} Platinum-based complexes, such as cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin, have become the most used metal-based drugs worldwide for cancer treatment by chemotherapy.^{3–5} However, although these anticancer drugs are very effective, their efficiency is limited due to the high incidence of resistance mechanisms. In addition, they lack selectivity toward cancer cells, which leads to numerous undesirable side effects such as nephrotoxicity, neurotoxicity, and ototoxicity, among others.^{6,7} As an alternative to classical chemotherapy, PDT emerged as a promising strategy for treating cancer. Treatments by PDT are based on a nontoxic prodrug called a photosensitizer (PS) that can be activated by light at the desired location.^{8,9} Upon photoactivation, the PS releases the energy needed to react

with the oxygen present in the tumor, producing reactive oxygen species (ROS) such as singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), superoxide radical ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hydroxyl radical ($\bullet\text{OH}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2). Such species are spatially and temporally confined to the irradiated region, thus targeting malignant tissues without attacking healthy ones.¹⁰ Two types of PDT have been described. In type II reaction, high amounts of highly toxic singlet oxygen are produced, causing oxidative damage in cells. In type I reaction, the PS in singlet or triplet excited state can react directly with a biological substrate and undergo hydrogen

Received: February 25, 2025

Revised: April 22, 2025

Accepted: April 28, 2025

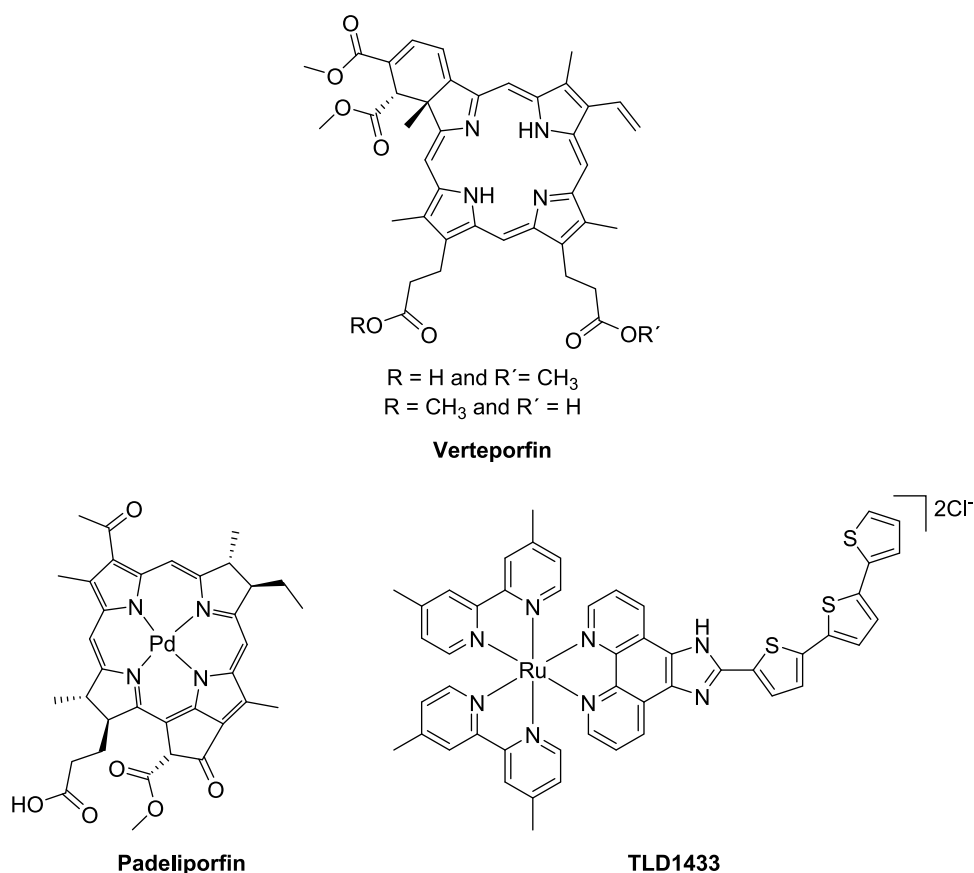


Figure 1. Compounds approved or in clinical trials as photosensitizers for PDT.

atom abstraction or electron transfer reactions, giving rise to highly reactive free radicals and radical ions, which can generate different ROS and cause cell death.^{11–13}

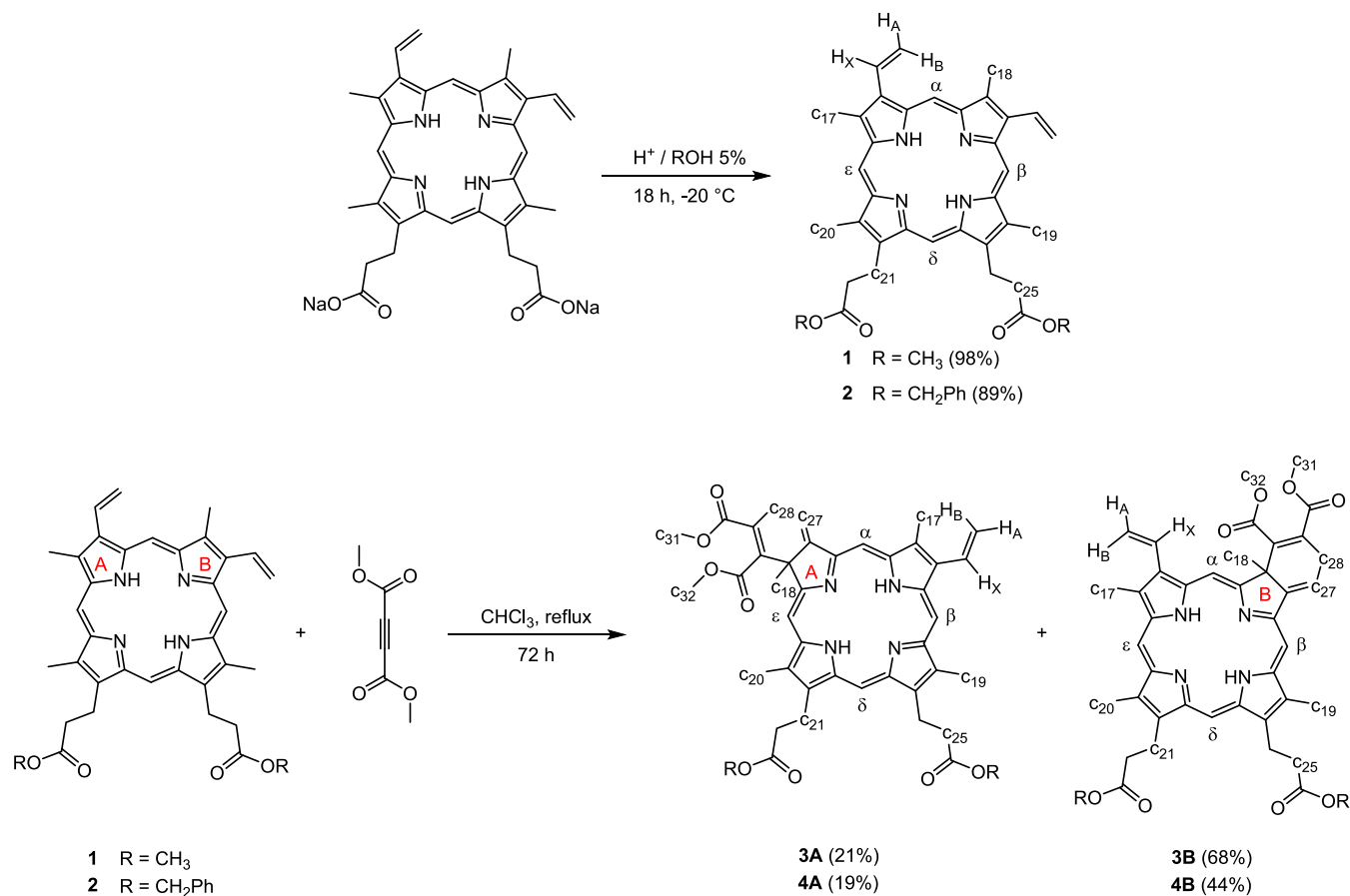
Ideally, a PS should preferentially (i) accumulate in tumors, (ii) display no toxicity in the dark, and (iii) be rapidly eliminated from the body.^{14,15} The PS should also present a high quantum yield of ROS production, a high molar extinction coefficient, and molar absorbance. Absorbance in the red spectral regions (600–800 nm) is desired for deep-seated tumors, *i.e.*, in cancers of the stomach, bladder, pancreas, esophageal or glioblastoma multiforme, among others.^{14,16} Compounds with highly conjugated π -bond systems, such as porphyrins and chlorins, are excellent light scavengers and are, therefore, ideal PS for PDT.¹⁷ Additionally, such tetrapyrrole structures can host a wide variety of metal ions. For example, it has been observed that metaloporphyrins with paramagnetic metal ions such as Cu(II) or Co(II) present low ROS production due to a decrease in the lifetime of the excited triplet state of the PS. On the contrary, metaloporphyrins with diamagnetic ions such as Zn(II), Pd(II), In(III), Ru(II), Ir(III), and Pt(II) present the heavy atom effect with a strong spin–orbital coupling that provides an absorbance lifetime long enough for the excited triplet state to interact with dioxygen, thus favoring the generation of ROS and, therefore, increasing the quantum yields.^{13,18,19} For instance, a palladium(II) metalochlorin complex (padeliporfin, TOOKAD) has been approved in several EU countries, Israel and Mexico, for use as a PS for the treatment of localized prostate cancer (Figure 1).²⁰ Ruthenium(II) complexes have generated interest as photosensitizers in PDT due to their favorable photophysical properties compared to other

transition metals, including broad absorption spectra and long excited state lifetimes. Moreover, the absorption and emission wavelengths can be precisely tuned through ligand design. Furthermore, ruthenium(II) complexes frequently exhibit high chemical and photochemical stability, allowing them to withstand light without degradation.^{21,22} In this respect, TLD1433 (Figure 1) is the first ruthenium-based PS that has entered a phase II clinical trial to treat noninvasive bladder cancer.²³ Interestingly, in most of the reports where porphyrins and ruthenium are used, the metal atom is found in the peripheries of the macrocycle, and only a few metaloporphyrins with the ruthenium atom in the central cavity have been described.^{24,25} However, many Ru(II) complexes are poorly soluble in water, which may limit their ability to reach target tissues. Low water solubility can cause aggregation, reduced bioavailability, and ineffective cellular uptake. The clinical applications of these complexes have also been restricted due to their cytotoxicity in the dark and low ROS generation efficiency.^{21,26}

It is worth mentioning that PDT is not only used in cancer treatment. For instance, verteporfin (VP, Visudyne) is widely used for treating macular degeneration.²⁷ However, the use of VP has several disadvantages, such as high phototoxicity and slow elimination by the body, meaning that the patient will be photosensitized for more than 48 h after the therapy.^{28,29}

Therefore, inspired by the photoproperties of porphyrins and chlorins, a ruthenium(II) ion was introduced in the central cavity of a series of tetrapyrroles to study their potential use as PS for the treatment of cancer, focusing on gastric cancer. Gastric cancer (GC) represents a public health problem due to its high aggressiveness, with a 5-year survival rate of less than

Scheme 1. Synthesis of Ligands and Numbering Used for NMR Assignment



25% and a median survival of about 11 months. It represents the fifth leading cause of cancer-related death in the world, after lung, breast, colon, and liver cancers, with around 769,000 deaths in 2020 (7.7% of all cancers), according to the World Health Organization (WHO).³⁰ In terms of incidence, GC is the fifth most common cancer, with more than one million new cases diagnosed in 2020 (5.6% of all cancers).^{31,32} Treatment options are still very limited, and patient management is mainly based on partial or complete gastrectomy combined with oxaliplatin-based (oxaliplatin + 5-Fluorouracyl) neoadjuvant and/or adjuvant chemotherapy. Unfortunately, the efficacy of the treatment is impaired by various resistance mechanisms,³³ notably due to mutation in p53, which is mutated in up to 70% of GC.³⁴ Consequently, there is an urgent need to develop new therapeutic solutions whose mode of action is independent of p53. In this respect, ruthenium-based anticancer compounds have been shown to induce cell death independently of p53, targeting different metabolic pathways and reducing tumor growth *in vivo*.^{35–37} In addition, as the gastric cavity is accessible by endoscopy, combining ruthenium with PDT would be an attractive solution for a localized GC treatment.

RESULTS AND DISCUSSION

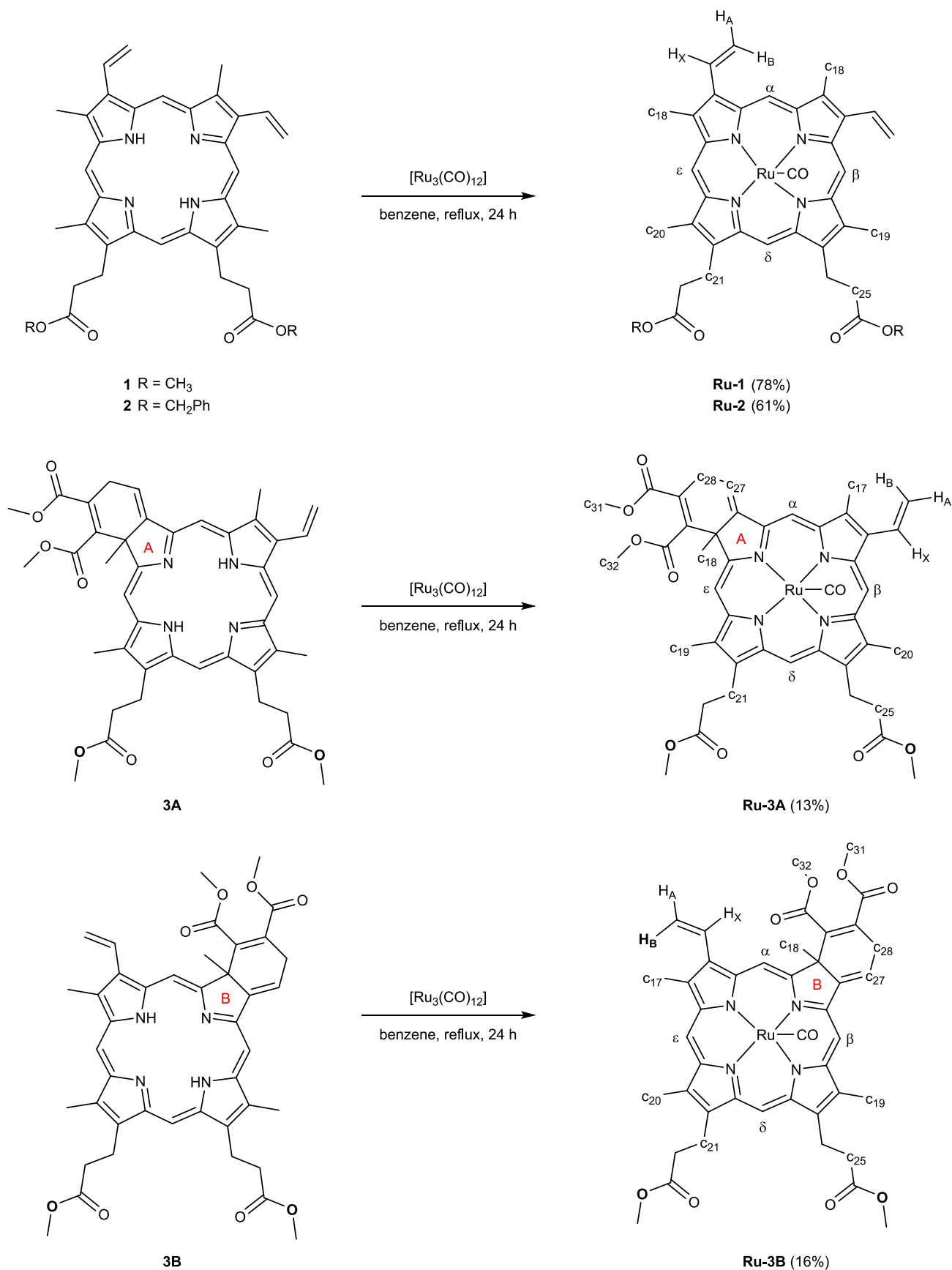
Chemistry. Synthesis and Characterization. The porphyrins **1** and **2** derived from protoporphyrin IX (**PpIX**) were synthesized by adapting a described procedure from commercial Na₂PpIX salt and methanol or benzyl alcohol in an acidic medium (Scheme 1).³⁸

Porphyrins **1** or **2** were used to prepare the chlorins through a Diels–Alder reaction, modifying a reported procedure.^{39,40} Porphyrin **1** or **2** was refluxed with dimethyl acetylenedicarboxylate (DMAD) in dry chloroform for 72 h to form mixtures of **3A** and **3B**, or **4A** and **4B** chlorins (Scheme 1). Isomers **A** and **B** were readily separated by column chromatography on silica gel and characterized by one-dimensional (1D) and two-dimensional (2D)-NMR techniques.

The **1** and **2** porphyrins and **3A** and **3B** chlorins were used as ligands to react with [Ru₃(CO)₁₂] to form the new ruthenium(II) complexes. Scheme 2 summarizes the synthesis of the ruthenium derivatives. Two strategies were used to synthesize ruthenium complexes based on chlorins. In the first approach, a mixture of chlorins **AB** was reacted with [Ru₃(CO)₁₂], followed by chromatographic separation of the resulting ruthenium complexes. However, the reaction yield was low, and the separation of the isomers was problematic. Therefore, the second methodology consisted of starting from the purified **3A** or **3B** isomers. Ruthenium complexes were obtained in 13 and 16% yields from the isolated isomer, respectively. The **4A** and **4B** ligands were not metalated as they were obtained in very low quantities. All the new ruthenium(II) derivatives are stable in air and light in the solid state and solution.

All the new compounds were characterized by IR, HR-MS, ¹H and ¹³C NMR, DEPT-135, HSQC, and HMBC, and their purity was confirmed by HPLC (Figures S1–S61). In addition, crystals suitable for single-crystal X-ray diffraction crystallography were obtained for **Ru-1** and **3B**.

Scheme 2. Synthesis of Ruthenium Complexes and Numbering Used for NMR Assignment



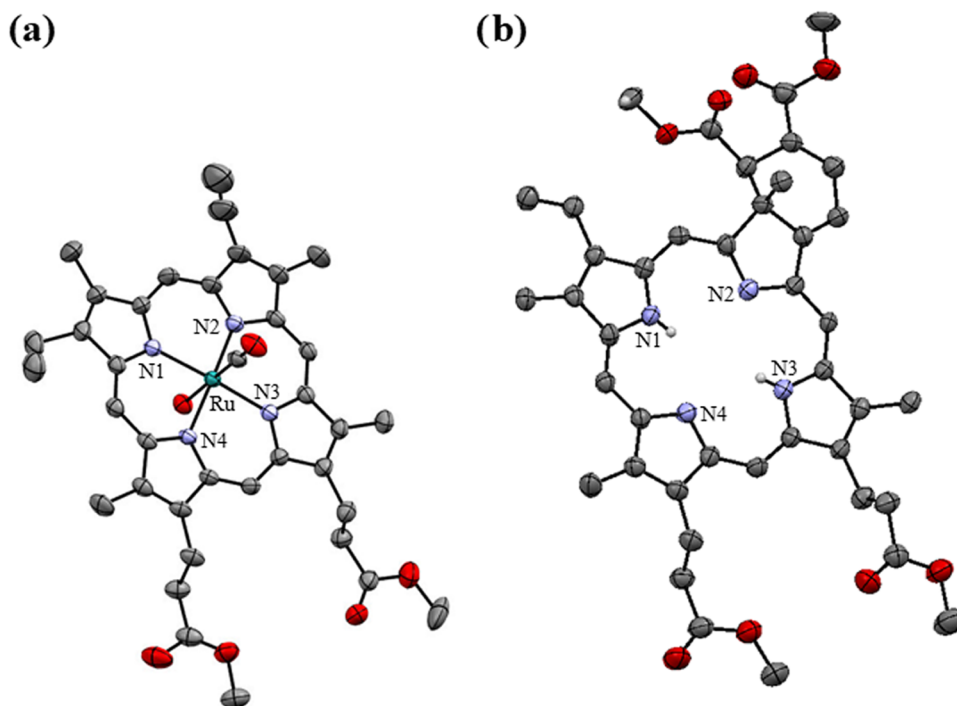


Figure 2. ORTEP diagrams (a) **Ru-1** and (b) **3B**. Thermal ellipsoids are drawn with a 40% probability level. Hydrogen atoms are omitted for clarity, except for N–H hydrogen atoms.

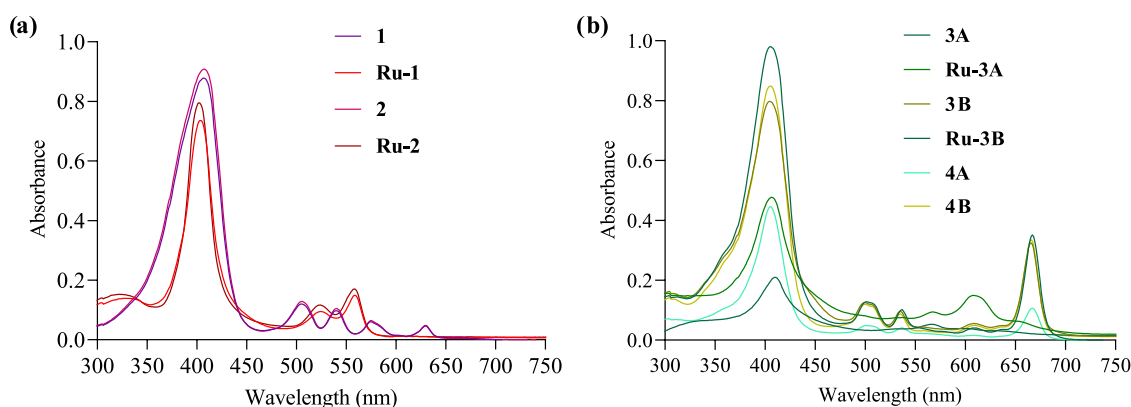


Figure 3. Absorption spectra of (a) porphyrins and metaloporphyrins and (b) chlorins and metalochlorins in DMSO, 1×10^{-5} M at 37 °C.

Crystallography. **Ru-1** and **3B** crystals were obtained by slow evaporation of a hexane/dichloromethane solution. **Figure 2** shows the ORTEP diagrams of the structures, and crystallographic data are summarized in **Table S1**.

Compound **3B** crystallized in an orthorhombic system with space group *Fdd2*, and the structure confirms the cyclo-addition. The bond distance between N–H1 and N–H2 is 0.737 and 0.701 Å, respectively. In addition, it is observed that the central structure of the chlorin is planar. **Ru-1** complex crystallized with a water molecule (probably from the solvents used for crystallization) in the *C2/c* space group. It has been reported that in similar porphyrin complexes, water, methanol, and ethanol molecules can weakly bind to the metal center *trans* to the CO ligand.^{41,42} The angle between the H₂O–Ru–C(O) atoms is 179.04°, while the angles between the nitrogen atoms of porphyrin and ruthenium atom are 173.72 and 173.83°, indicating that the structure exhibits a slightly distorted octahedral geometry. The bond distances between Ru–CO and Ru–OH₂ are 1.782(5) and 2.224(4) Å,

respectively. The bond distances between Ru–N1, Ru–N2, Ru–N3, and Ru–N4 are 2.051, 2.057, 2.050, and 2.059 Å, respectively.

Electronic Absorption. The ultraviolet–visible (UV–vis) absorption spectra of the ligands and complexes were measured in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 37 °C at a 1×10^{-5} M. **Figure 3** shows the spectra for the ligands and complexes, and electronic absorption data are given in **Table S2**.

A strong Soret absorption band around 400 nm is observed in all the UV–vis spectra, indicating π – π^* transitions (**Figure 3**).⁴³ For the ligands, four Q bands in the visible region are attributed to an π – π^* electronic transition ($a_{1u} \rightarrow e_g^*$) arising from the ground state (S_0) to the second excited state (S_2).⁴⁴ For the metaloporphyrinoid derivatives, the bands around 500 to 600 nm are assigned to charge transfer transitions, π – $d\pi$ between the tetrapyrrole ring and the metal. In the complexes, the decrease in the number of Q bands is ascribed to a change

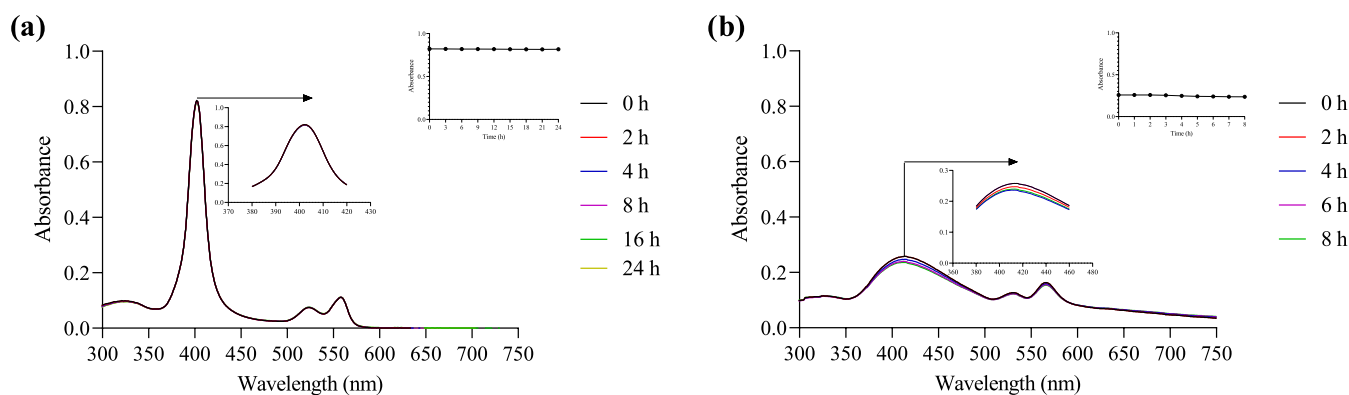


Figure 4. Stability assay for **Ru-1** in (a) DMSO and (b) PBS/DMSO 0.1%. Inset: plot of absorbance vs time.

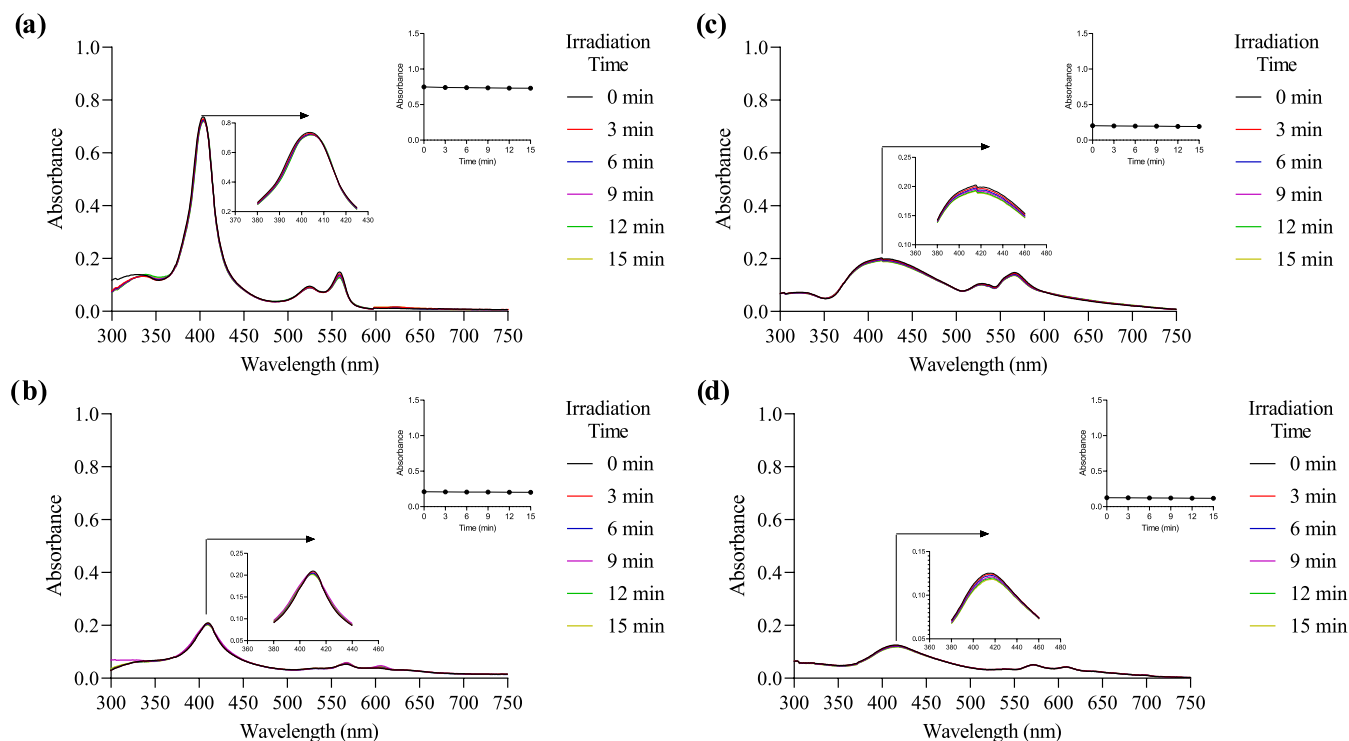


Figure 5. Photodegradation of compound **Ru-1** (a, c) and **Ru-3B** (b, d) in DMSO and PBS/DMSO (0.1%) upon irradiation with white light (50% intensity of a 12 W lamp). Inset: plot of absorbance vs time.

in the symmetry, from D_{2h} to D_{4h} , due to the deprotonation and cation formation.^{43,44}

Stability. The stability of the compounds was evaluated by UV-vis spectroscopy. Figures S62–S70 show the absorption spectra of each compound in DMSO for 24 h at 37 °C at a concentration of 1×10^{-5} M. The stability was also evaluated in PBS containing 0.1% DMSO (1×10^{-5} M) at 37 °C for 8 h. In DMSO, practically no decomposition of the compounds was observed (Figure 4a). However, in PBS/DMSO (0.1%), a slight decomposition was noted (between 1–10%), as seen in Figure 4b. Figures S71–S79 show the absorption spectra of each compound in PBS/DMSO (0.1%). However, in the case of compound **Ru-2**, the decomposition was more important (48% in PBS/DMSO), as observed in Figure S73.

Photobleaching. Degradation of the molecules upon light irradiation can cause problems in applications such as photodynamic therapy.⁴⁵ Photodegradation is an oxidative degradation of a molecule over time into fragments of lower

molecular weight, implicating that the molecule may lose its photodynamic activity during irradiation.^{46,47}

The measurement of light tolerance and stability of each compound was studied by UV-vis spectroscopy at 37 °C at 1×10^{-5} M. The cell was irradiated with white light, and a spectrum was recorded every 3 min until a total of 5 measurements (15 min). Figure 5 shows the spectra obtained during **Ru-1** and **Ru-3B** photobleaching in pure DMSO (Figure 5a) and PBS/DMSO (0.1%) (Figure 5b). Spectra for the remaining compounds are shown in Figures S80–S87. In all cases, only a slight decrease (1–5%) in the absorption of the Soret band (404–410 nm) was observed.

Fluorescence and Singlet Oxygen Formation Quantum Yield Measurements. Emission spectra were measured in DMSO. The free ligands were excited at 503 nm, while the ruthenium complexes were excited at 573 nm. The spectra are shown in Figures S88–S93. For the calculation of fluorescence quantum yield, verteporfin ($\Phi_f = 0.0085$) was used as a

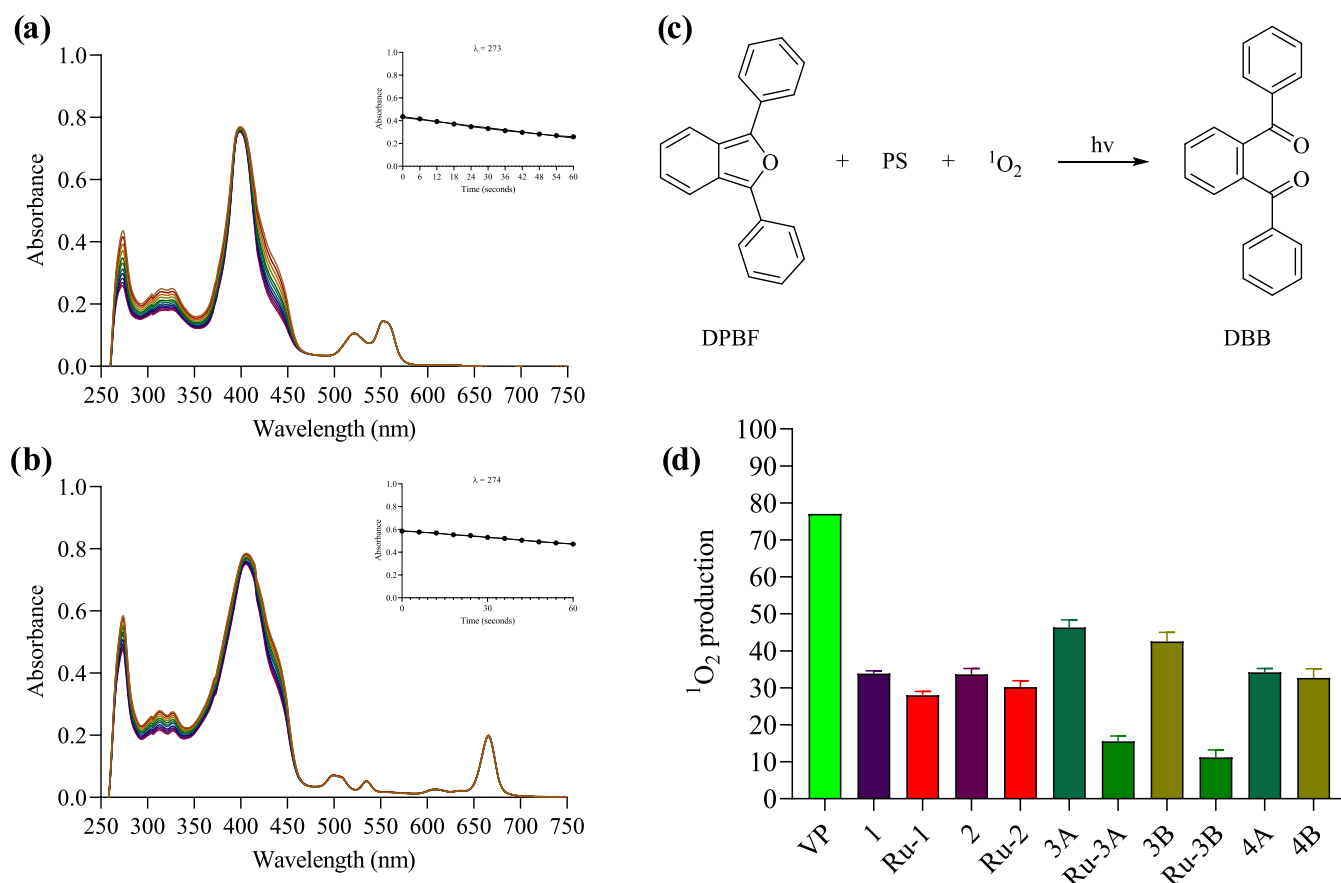


Figure 6. Absorption changes during the determination of singlet oxygen quantum yield of Ru-1 (a) and 3B (b) using DPBF as singlet oxygen trapping in DMSO equilibrated with air (inset: plot of absorbance at 274 nm vs irradiation time). (c) Reaction between DPBF and photosensitizer in the presence of light and oxygen. (d) Percentage singlet oxygen formation quantum yield relative to verteporfin ($\Phi_\Delta = 0.77^{46}$). [PS] = 7×10^{-6} M; [DPBF] = 2×10^{-5} M, $N = 3$.

reference.⁴⁶ The results are shown in Table S2. In all metal-free compounds, an intense emission band at approximately 630–670 nm and a small band at approximately 700–750 nm were observed, assigned to Q (0–0) and Q (1–0) transitions, respectively.⁴⁸ On the other hand, the new ruthenium(II) complexes showed no emission. A similar behavior has been observed in palladium(II) and nickel(II) metaloporphyrins, where the fluorescence was quenched due to electron or energy transfer.⁴⁹

An indirect method was used to calculate the singlet oxygen production quantum yield of all compounds using 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF), which in the presence of 1O_2 oxidizes to 1,2-dibenzoylbenzene (DBB) (Figure 6c). Verteporfin was selected as a reference ($\Phi_\Delta = 0.77$ in DMSO).⁴⁶ The spectral change of the absorbance band at 274 nm of the DPBF scavenger was monitored to determine the singlet oxygen generation. Eleven measurements were made in a spectrophotometer, one measurement every 6 s after irradiating the samples with white light, for a total of 60 s. Figure 6d summarizes the data obtained.

In all cases, the absorbance of DPBF at 274 nm decreased in the presence of the compounds, confirming the generation of singlet oxygen. All the compounds, but Ru-3A and Ru-3B, were highly efficient in generating singlet oxygen, with quantum yields between 30 and 50%. Interestingly, for Ru-3A and Ru-3B, the singlet oxygen quantum yields were much lower (15% and 11%, respectively) than for the corresponding

free ligands (3A and 3B) and the other ruthenium complexes (Figure 6d).

Determination of ROS Production. Since singlet oxygen has a very short half-life, a spin trap and detection of the generated radical by electron paramagnetic resonance (EPR) were used as an indirect method to monitor its formation. The spin trap of choice was 2,2,6,6-tetramethylpiperidine (TEMPO), as it can readily be converted into the stable radical 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy (TEMPO) in the presence of singlet oxygen. The formation of TEMPO was monitored by continuous white light irradiation of the PS *in situ* for 15 min. As seen in Figure 7a–d, the characteristic triplet signal ($g = 2.0063$ and $hfcc = 1.63$ mT) for TEMPO was detected for all compounds. However, as previously observed, the production of 1O_2 by the metalochlorins Ru-3A and Ru-3B was much lower (Figure 7e).

Because our compounds were producing 1O_2 under normal conditions, the effect of the oxygen concentration in the samples was evaluated. Compounds 1, Ru-1, 3B, and Ru-3B were selected for this experiment. Interestingly, compound Ru-1 produced significant amounts of 1O_2 at low oxygen concentrations, which might indicate that it could potentially be active in type II PDT on hypoxic cancer cells.⁵⁰ Figure 8 shows the EPR spectra obtained at different O_2 concentrations for Ru-1, and the spectra for compounds 1, 3B, and Ru-3B are shown in Figures S94–S96, respectively.

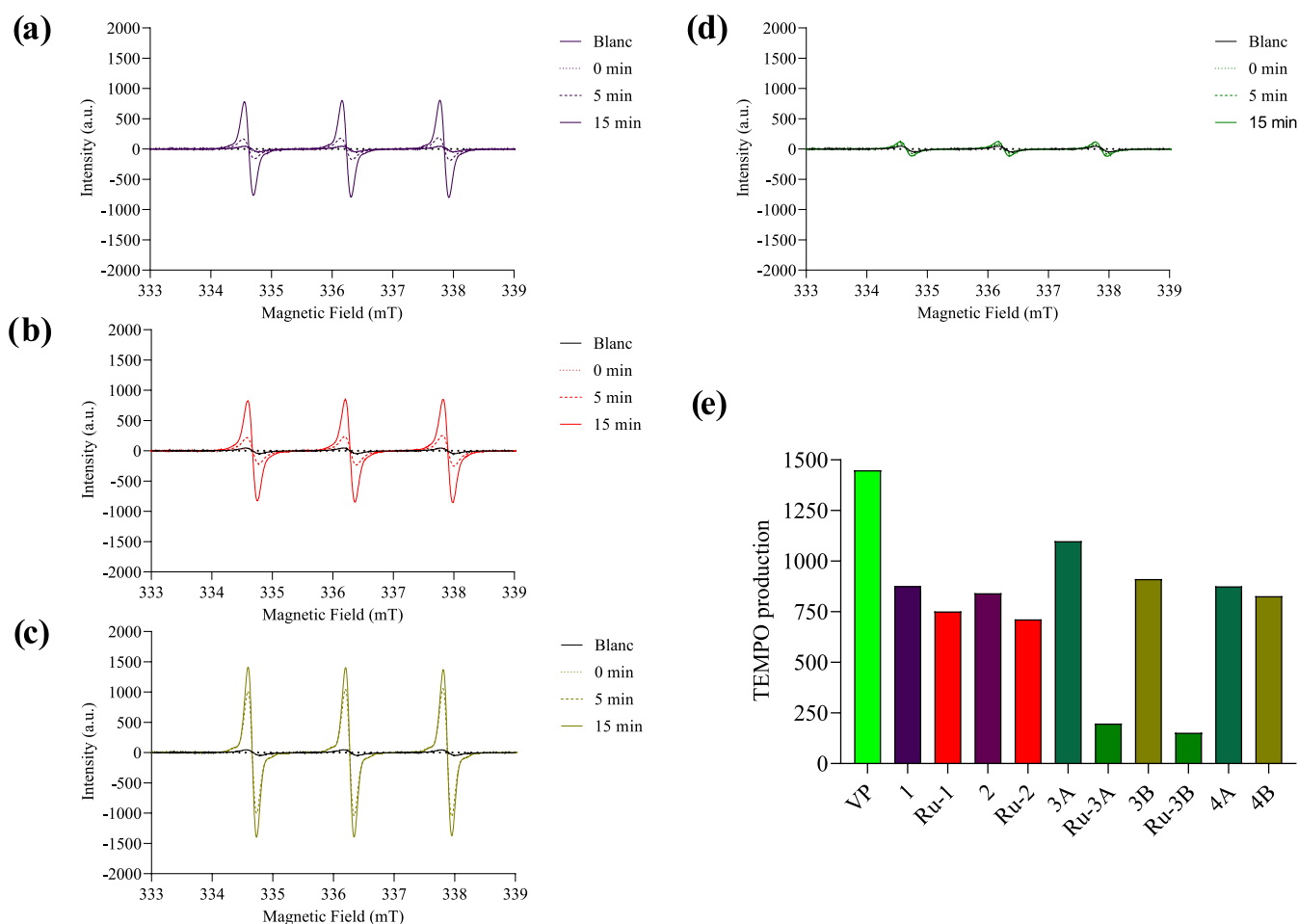


Figure 7. EPR spectra upon irradiation with white light of the PS in the presence of TEMP spin trap in ethanol/DMSO at room temperature: (a) 1, (b) Ru-1, (c) 3B, and (d) Ru-3B. (e) TEMPO signal intensity after 15 min of irradiation. [PS] = 1×10^{-3} M, [TEMP] = 4×10^{-3} M, blanc = spectra of TEMP without PS.

Contemplating that type I PDT can also occur when the PS is irradiated, the possibility that the metalochlorins **Ru-3A** and **Ru-3B** can generate ROS different from $^1\text{O}_2$ was investigated. Therefore, another spin trap, 5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO), able to react with superoxide radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ was used. Figure 9a–c show the EPR spectra obtained in the presence of DMPO before and after irradiation with white light for 15 min. As expected, no ROS is produced without the PS (Figure 9a). When the sample containing the PS (**Ru-3A** or **Ru-3B**) and DMPO was irradiated with white light for 15 min, the characteristic signal and coupling constants for the DMPO- $\text{O}_2^{\bullet-}$ adduct ($g = 2.0060$, $h_{\text{fcc}} = 1.330$ mT) were observed (Figure 9b,c).^{51,52} Such results confirm that our metalochlorins can exhibit combined mechanisms of action for PDT, *i.e.*, they can produce singlet oxygen in the type II mechanism, as well as the superoxide radical in a type I mechanism. The Soret band of **Ru-3A** and **Ru-3B** metalochlorins showed a lower absorption intensity than for ligands **1**, **2**, **3A**, and **3B**, and complexes **Ru-1** and **Ru-2**. A higher Soret band absorption intensity usually indicates a larger gap between the highest occupied molecular orbital (HOMO) and lowest unoccupied molecular orbital (LUMO), while a lower Soret band absorption intensity means a smaller HOMO–LUMO gap.^{53,54} According to the literature, a small HOMO–LUMO gap facilitates the intermolecular transfer of photo-induced electrons from the excited triplet state to the ground

state to produce the superoxide radical, as observed in our study.⁵⁵ However, theoretical calculations in the excited states are necessary to fully explain why the metalochlorins specifically produce superoxide radicals.

Lipophilicity. The *n*-octanol/water partition coefficient ($\log P_{\text{o/w}}$) is a well-established parameter that helps to predict the biological activity of drugs and other biologically active compounds.⁵⁶ The so-called “shake-flask” method was adopted to determine the partition coefficient using 1-octanol and PBS (phosphate-buffered saline) as solvents.⁵⁷ The results are summarized in Table 1. All the porphyrin derivatives presented low lipophilicity values. At the same time, the chlorin compounds were much more lipophilic as expected due to the reduction of one of the pyrrole rings and the formation of the new ring in the chlorin.

Biological Assays. Impact of Porphyrins, Chlorins, and Ru(II) Compounds on Gastric Cancer Cell Survival. To assess the anticancer potential of compounds, the cytotoxicity was evaluated on the gastric cancer cell line AGS. The cells were treated in the dark for 8 h with increasing concentrations of the different compounds (Table 2). Cisplatin was used as a positive cytotoxic and clinically used drug control, and verteporfin (VP) or protoporphyrin-IX (PpIX) were used as positive PDT controls. Cells were then irradiated for 15 min with white light or kept in the dark and further cultivated for 48 h in the dark. An MTT test was then performed to evaluate

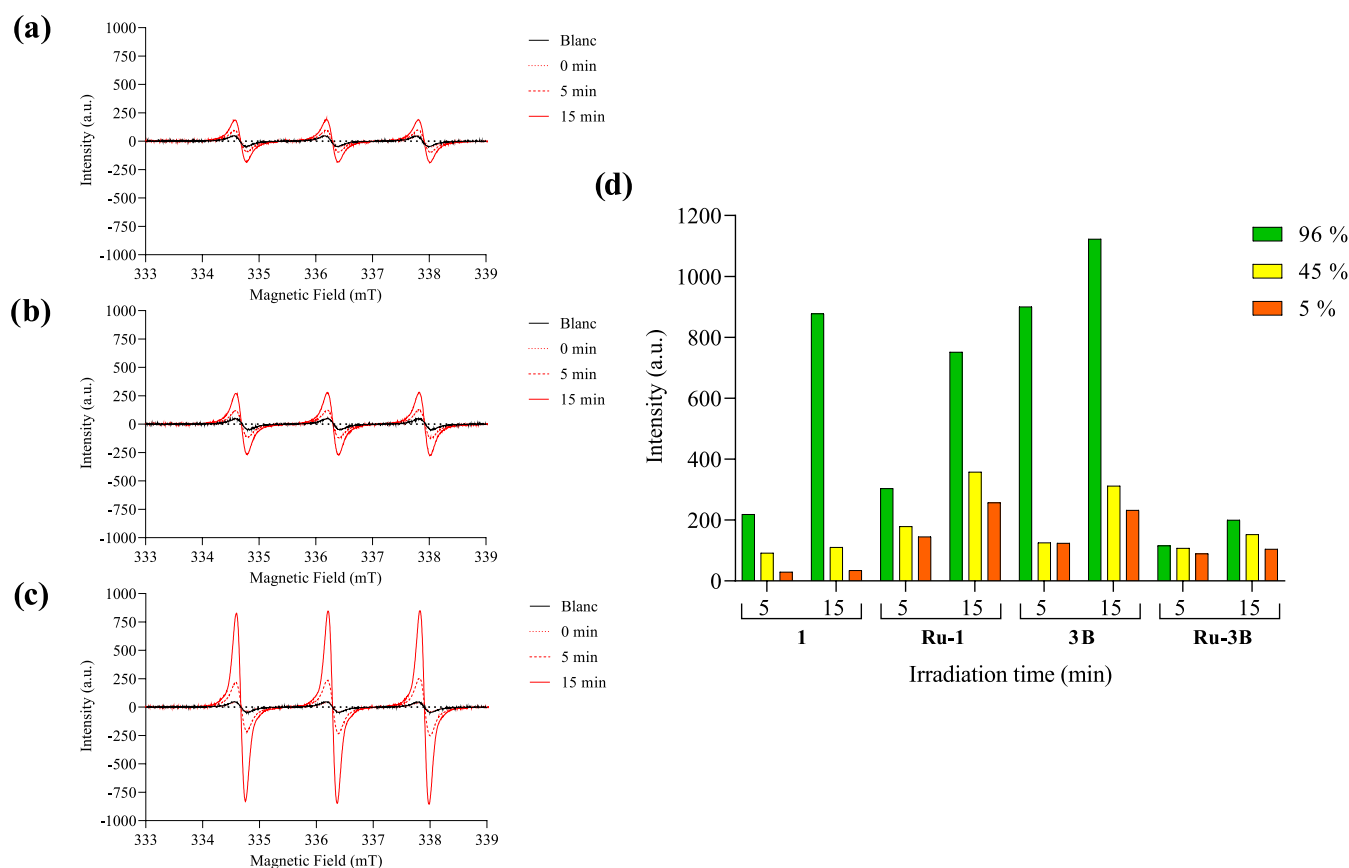


Figure 8. EPR spectra upon irradiation for 5 and 15 min of **Ru-1** in the presence of TEMP varying the oxygen concentration: (a) 5% of oxygen, (b) 45% of oxygen, (c) 96% of oxygen. (d) TEMPO signal intensity for compounds **1**, **Ru-1**, **3B**, and **Ru-3B** at 15 min of irradiation at different oxygen concentrations. [PS] = 1×10^{-3} M, [TEMP] = 4×10^{-3} M, blanc = spectra of TEMP without PS.

the impact of the different treatments on cell survival. This demonstrated that in the dark, and, in contrast to cisplatin ($IC_{50} = 29 \mu M$) and verteporfin ($IC_{50} = 7 \mu M$), all compounds displayed very low toxicity on AGS cells, with an IC_{50} which could not be calculated, except for **Ru-1** ($IC_{50} = 95 \mu M$) and **Ru-3A** ($IC_{50} = 64 \mu M$) (Table 2, Figures 10, and S97–S101). After irradiation, all compounds showed a marked increase in their toxicity, ranging between 0.1 and $4 \mu M$, which, except for **Ru-2** ($IC_{50} = 51 \mu M$), were below the IC_{50} of cisplatin (Figure 10 and Table 2). The difference in the observed toxicity is most likely not due to a difference in cellular uptake, as there does not appear to be a correlation between their lipophilicity and the IC_{50} values. The lower cytotoxicity of **Ru-2** is most likely due to its low stability in biological media, as determined by stability tests in PBS/DMSO. The phototoxicity index (PI) was calculated based on the IC_{50} dark/light ratio, and values as high as 1000 and 555 were calculated for compounds **3A** and **3B**, respectively.⁵⁸

Given these results, compounds **1**, **Ru-1**, **3B**, and **Ru-3B** were selected as lead compounds for further studies. **Ru-3B** complex is of special interest as it could present different PDT mechanisms, combining the production of 1O_2 by the type II mechanism and $O_2^{\bullet-}$ radicals by a type I mechanism (as mentioned above). This capacity might be of significant importance for the design of new PS since the production of $O_2^{\bullet-}$ radicals does not directly depend on the concentration of oxygen present in the hypoxic microenvironment of cancer cells.^{59–61}

Induction of Cell Deaths by Porphyrins, Chlorins, and Ruthenium Compounds. The therapeutic effects of PDT treatment on cancer cells are thought to be mainly related to ROS production, which are highly reactive and cytotoxic species that can induce cell death by apoptosis.⁶² It has also been shown that ruthenium compounds can induce different cell death pathways.^{63,64} For these reasons, we initially analyzed by Western blot the expression of cleaved caspase 3 and PARP, which are two well-known markers for programmed cell death apoptosis.^{65–70} For this, AGS cells were treated at the IC_{50} of each compound for 4 h in the dark and then irradiated, or not, with white light for 15 min. The cells were then further cultivated in the dark for 24 h. Figure 11 shows that, except for **PpIX**, all compounds induced the cleavage of caspase 3 and PARP after irradiation, notably compound **1**, which was as efficient as **VP**. Then, the protein expression of CHOP, a key component of the endoplasmic reticulum (ER) stress-mediated apoptosis pathway and known to be induced by ruthenium compounds, was evaluated.^{71,72} All compounds, except for **PpIX**, induced the expression of CHOP upon irradiation. Interestingly, CHOP expression was much more strongly induced by the ruthenium compounds compared to their respective free ligands or verteporfin, suggesting that they possibly lead to a much stronger accumulation of misfolded or unfolded proteins and/or ROS production (Figure 11).^{73,74} Furthermore, CHOP has been reported to participate in the regulation of ER stress-mediated autophagy.^{75–77} Autophagy is a cellular self-degradation system that facilitates the degradation of damaged organelles and

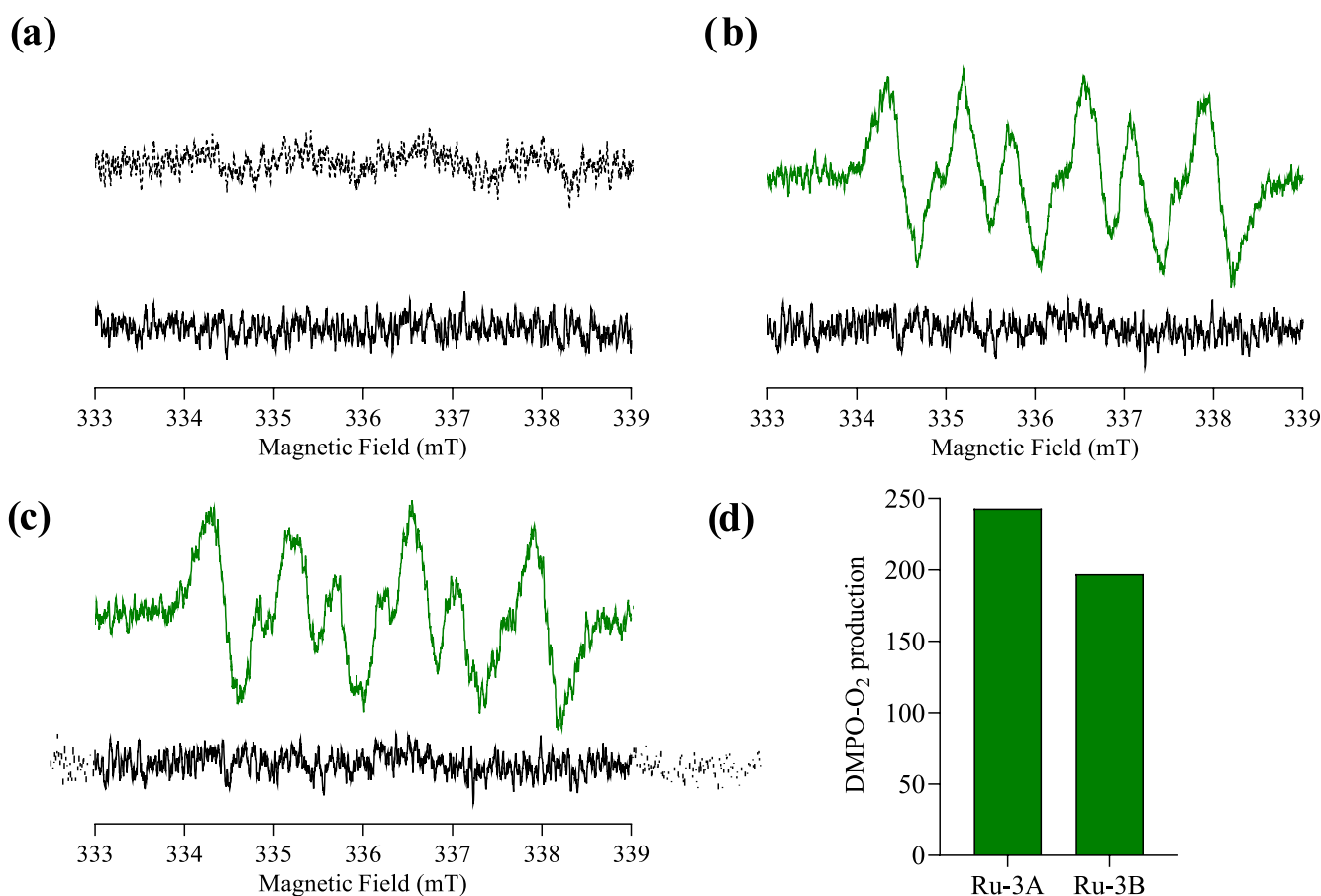


Figure 9. EPR spectra in methanol/DMSO at room temperature: (a) DMPO in the dark (solid line) and upon irradiation (dotted line), (b) Ru-3A in the dark (black) and upon irradiation (green), and (c) Ru-3B dark (black) and upon irradiation (green). (d) DMPO- O₂^{•−} signal intensity after 15 min of irradiation. [PS] = 1×10^{-3} M, [DMPO] = 0.07 M. Irradiation time = 15 min.

Table 1. Partition Coefficient ($\log P_{O/PBS}$) of Compounds^a

compound	$\log P_{O/PBS}$
1	0.957 ± 0.056
Ru-1	1.014 ± 0.058
2	1.063 ± 0.142
Ru-2	1.032 ± 0.108
3A	1.478 ± 0.083
Ru-3A	1.396 ± 0.051
3B	1.661 ± 0.088
Ru-3B	1.510 ± 0.177
4A	1.368 ± 0.042
4B	1.682 ± 0.176
VP	1.374 ± 0.064

^aThe value obtained is the average of three independent experiments at 27 °C.

misfolded or mutant proteins.⁷⁸ In cancer, autophagy protects tumor cells during cancer progression. However, it can also suppress cancer cell development or induce cell death.^{79,80} Autophagy is characterized by the formation of autophagosomes, which express LC3B proteins. To investigate this, the expression and conversion of LC3B-I to LC3B-II was analyzed by Western blot (Figure 11). The results show that following irradiation, all ruthenium compounds induced the expression of LC3B-I and LC3B-II (Figure 11). Interestingly, upon light activation, 3B and Ru-3B led to a marked induction of LC3B-I/II expression, similar to verteporfin,

Table 2. Mean Inhibitory Concentrations (IC₅₀) of the Compounds in AGS Gastric Cancer Cells^a

compound	IC ₅₀ (μM)		
	light	dark	PI
cisplatin		29	
PpIX	0.5	>100	>200
Vp	0.003	7	=13,270
1	1.7 ± 0.184	>100	>17
Ru-1	3.8 ± 0.379	95 ± 0.462	=25
2	2.6 ± 0.100	>100	>18
Ru-2	51.3 ± 1.249	>100	>2
3A	0.1 ± 0.06	>100	>1000
Ru-3A	1.7 ± 0.100	64.1 ± 0.815	=38
3B	0.2 ± 0.021	>100	>555
Ru-3B	3.2 ± 0.252	>100	>31
4A	2.5 ± 0.231	>100	>40
4B	2.8 ± 0.265	>100	>36

^aCells were incubated for 8 h, followed by irradiation with white light for 15 min or kept in dark condition. The MTT assay was performed to determine cell viability after 48 h of treatment. *N* = 3.

suggesting a specific induction of autophagy (Figures 11 and S102)

Ferroptosis, another form of nonapoptotic cell death, can promote inflammation and is triggered by iron-catalyzed lipid peroxidation *via* Fenton-type reactions, where the main ROS responsible for lipid damage are hydroxyl radical and

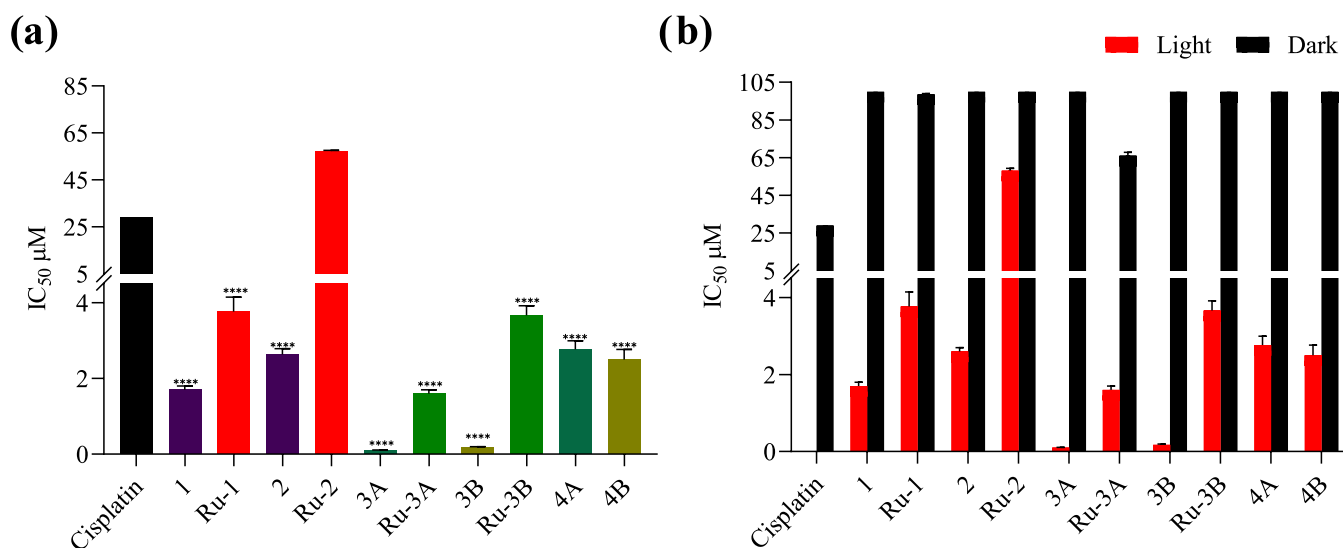


Figure 10. (a) Graphs showing the mean IC_{50} inhibitory concentrations presented in Table 2. Student's *t*-test is considered significant at $p < 0.5$. * < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.001 , **** < 0.0001 with respect to cisplatin. (b) Comparison of the minimum inhibitory concentration in the dark and activated under irradiation with white light for 15 min.

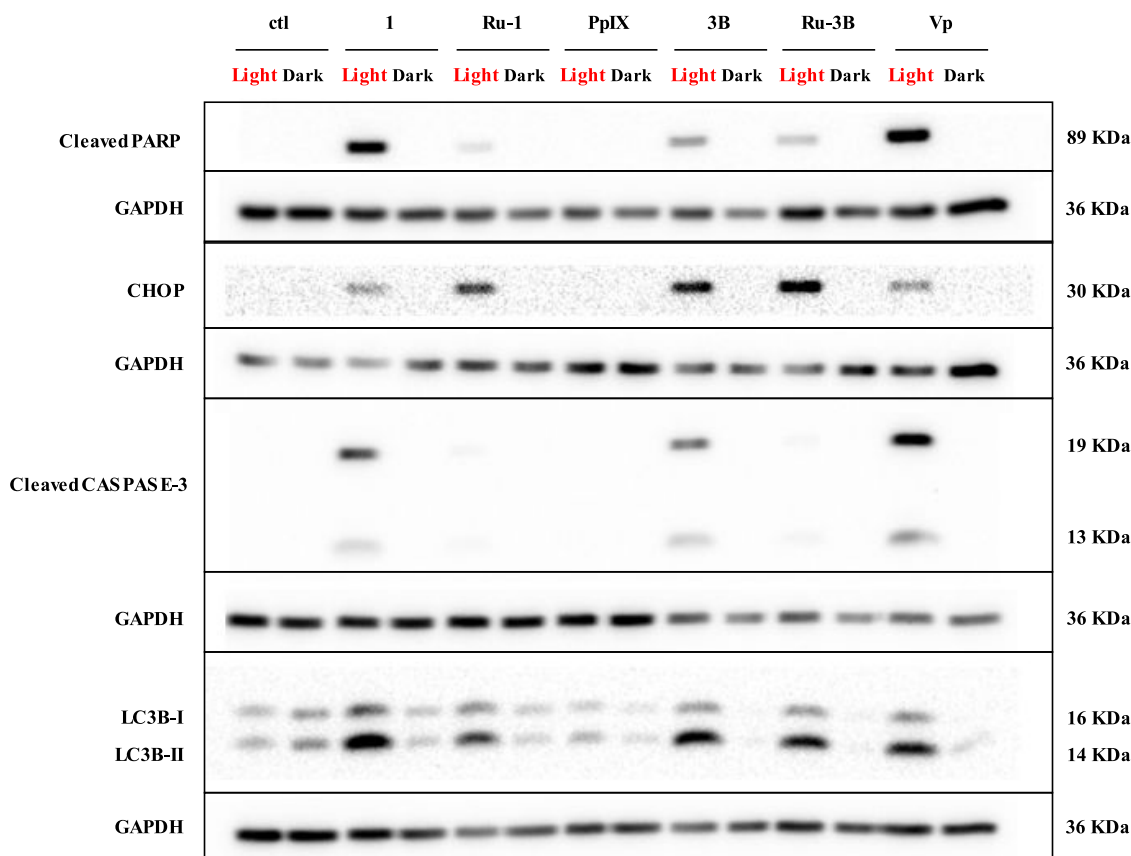


Figure 11. Effects of photoactivation of 1, Ru-1, 3B, and Ru-3B on protein expression on different cell death markers in AGS gastric cancer cells. AGS cells were treated with 1, Ru-1, 3B, Ru-3B, PpIX, or VP at IC_{50} concentrations for 4 h and then either irradiated with white light or kept in the dark for 15 min and then further cultivated for 24 h in the dark. Protein extraction was performed, and expression of the different markers was determined by Western blot. GAPDH was used as a loading control. Representative Western blot of three independent experiments. ctl = control, untreated cells.

superoxide radical.^{81,82} Glutathione peroxidase (GPX4) can suppress lipid peroxidation and protect cells from ferroptosis.⁸³ To investigate the impact of the different compounds on GPX4 expression, AGS cells were treated as described above, and then GPX4 expression was analyzed by Western blot

(Figure 12a). This showed that upon activation by light, PpIX and Ru-3B lead to a decrease in GPX4 expression (Figure 12a,b), which suggests that these two compounds might induce ferroptosis.

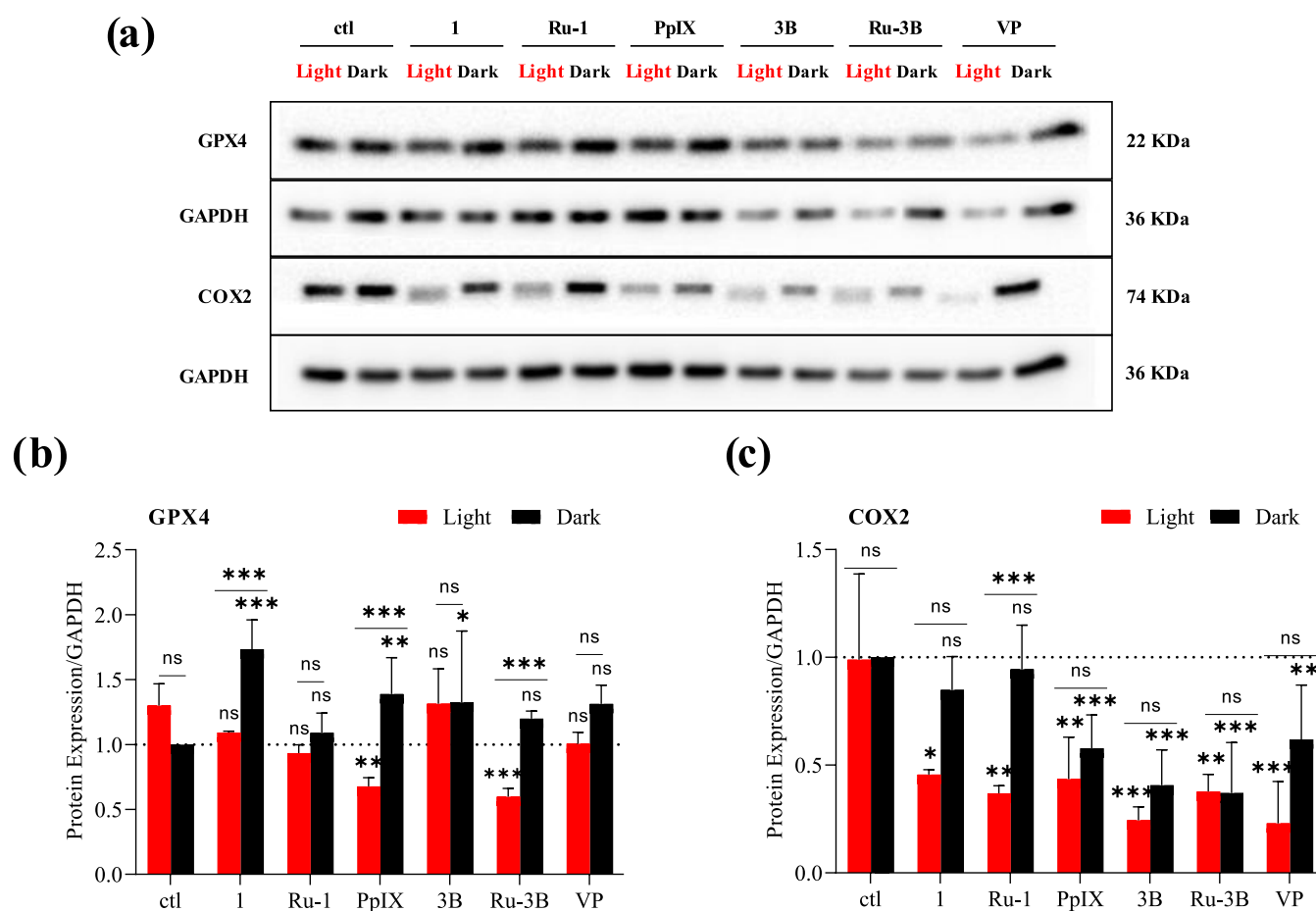


Figure 12. Effects of photoactivation of **1**, **Ru-1**, **3B** and **Ru-3B** on protein expression of ferroptosis and inflammation markers in AGS gastric cancer cells. AGS cells were treated with **1**, **Ru-1**, **3B**, **Ru-3B**, **PpIX**, or **VP** at IC_{50} concentrations for 4 h and then either irradiated with white light or kept in the dark for 15 min and then further cultivated for 24 h in the dark. (a) Expression of the different markers was determined by Western blot. GAPDH was used as a loading control. Representative Western blot of three independent experiments. **ctl** = control, untreated cells. Graphs represent the quantification of three independent experiments of GPX4 (b) and COX2 (c) expression, compared to not-treated AGS cells (**ctl**) and normalized to GAPDH expression. Bars above the colons indicate the comparison of dark *versus* light for each compound. The dark and light results of each compound were compared to those of the respective untreated control condition (**ctl**). Statistical analysis: 2-way Anova * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001 , ns = not-significant.

COX2 is known for its central role in inflammation and prostaglandins (PGs) production. In normal cells, COX2 expression is almost absent, whereas in cancer cells, it is frequently overexpressed.⁸⁴ Importantly, it has been shown that in cancers, COX2 is not only a mediator of inflammation but could also be a mediator of oxidative stress and inhibition of apoptosis, as well as cancer cell proliferation.⁸⁵ The expression of COX2 was analyzed by Western blot (Figure 12a), showing that upon light irradiation, compounds **1** and **Ru-1** significantly reduce COX2 expression compared to untreated conditions. In contrast, **PpIX**, **3B**, **Ru-3B**, and **VP** already lead to a reduction in COX2 expression in the dark (Figure 12a,c). These results suggest that the effect of **PpIX**, **3B**, **Ru-3B**, and **VP** on cell survival upon light activation may not be due to their repressive influence on COX2 expression.

CONCLUSIONS

A series of tetrapyrrole-ruthenium(II) compounds derived from protoporphyrin IX and the commercial drug verteporfin were designed as potential photosensitizers for PDT. The introduction of the ruthenium atom in the central cavity of the macrocycle did not affect the low toxicity in the dark on

human gastric cancer cells compared to the free ligands while displaying remarkable cytotoxicity upon irradiation with light. Additionally, our results show that the complexes could cause cell death under low oxygen concentrations by generating singlet oxygen or superoxide anion radicals. Notably, the ruthenium atom coordinated to the chlorin ligands allowed combined mechanisms since EPR studies showed that both singlet oxygen and superoxide radicals could be produced by complexes **Ru-3A** and **Ru-3B** after irradiation. The ruthenium complex **Ru-1** also produced large amounts of singlet oxygen at very low oxygen concentrations. Such results are significant since these new photosensitizers could be used for PDT in hypoxic environments, as often found in tumors. In addition, the study demonstrates that upon light activation, the ruthenium derivatives not only induce cell death *via* a caspase 3 mediated apoptotic pathway, but also partly *via* CHOP, which is an endoplasmic reticulum (ER) stress-inducible transcription factor involved in the development of apoptosis and growth arrest. These data confirm that the new ruthenium compounds can be tuned to trigger various cell death pathways and highlight the potential of our complexes as promising

multitarget therapeutic alternatives that could reduce tumor resistance mechanisms.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemistry. Reagents and Measurements. The compounds were synthesized using a double vacuum/inert gas line under a nitrogen or argon atmosphere. All solvents were dried using established procedures and distilled under nitrogen prior to use. All reagents were purchased from Sigma-Aldrich and were used without prior purification. RuCl₃ was purchased from Pressure Chemical Company. Ruthenium precursor [Ru₃(CO)₁₂] was prepared according to previously reported procedures.⁸⁶

The reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) using silica gel 60 F₂₅₄ alumina plates (Merck). Infrared spectra were recorded on an α ATR spectrometer from Bruker Optics. Mass spectra (FAB⁺) were obtained using a Jeol JMS-SX102A instrument with *m*-nitrobenzyl alcohol as the matrix. Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) was performed using a Bruker Esquire spectrometer. The NMR spectra were recorded at room temperature using deuterated chloroform, acetone, or acetonitrile as solvent on a Bruker Advance spectrometer at 300 MHz for proton and 75 MHz for carbon and on a Bruker Advance spectrometer at 500 MHz for proton and 125 MHz for carbon. Chemical shifts (δ) are in ppm downfield of TMS using the residual solvent as an internal standard. Coupling constants (*J*) are expressed in Hz. Multiplicity: s = singlet, d = doublet, t = triplet, sept = septuplet, m = multiplet. The UV–vis absorption spectra were recorded on a Shimadzu 2600 spectrophotometer in a quartz cuvette at 37 °C with 1 × 10^{−5} M solutions of each compound in DMSO (prepared from a 10 mM stock solution). The fluorescence spectra were obtained in an Agilent Varian Cary 100 spectrophotometer in quartz cuvettes at room temperature. Electron paramagnetic resonance (EPR) determinations were carried out in an EPR spectrometer (Jeol JES-TE300), operated in the X-Band mode at a modulation frequency of 100 kHz with a cylindrical cavity (TE₀₁₁). Each sample was placed in a quartz flat cell (Wilmad Glass Company) and irradiated *in situ*. The photogeneration of ¹O₂ was carried out with a 500 Hg Arc lamp (Oriel OPS-A500), and the samples were irradiated continuously at 160 W. Data acquisition and manipulation were done using the ES-IPRIT/TE program. The HPLC chromatograms were recorded on an Agilent model 1200 Series Binary SL system with a UV–vis detector (λ = 400 nm) and an Eclipse Plus C₁₈ (3.5 μ m × 2.1 mm) column. The flow rate was 0.2 mL/min, with the initial mobile phase acetonitrile–water (60:40) for the first 10 min. Then acetonitrile–water (90:10) for 20 min and finally acetonitrile for 20 min.

Synthesis of the Ligands. Synthesis of Porphyrin Derivatives. Porphyrin 1. The esterification reaction was carried out by adapting a reported procedure.³⁸ A solution of 95.0 mL of dry methanol and 5.0 mL of H₂SO₄ at 5% (v/v) was cooled to −20 °C in a cold bath, and 1.0 g (1.648 mmol) of the disodium salt of the protoporphyrin IX (Na₂-PpIX) was added. The reaction mixture was stirred overnight at −18 °C in the dark. The solution was neutralized with a 10% aqueous solution of NaHCO₃, and the organic phase was extracted with 200 mL of CHCl₃ and dried over Na₂SO₄. The solvent was evaporated to dryness under vacuum, and the crude solid was purified by column chromatography (silica gel, (1/10) ethyl acetate/dichloromethane) to give 954 mg of a purple solid in 98% yield. The purity observed by HPLC is >99%.

MS (FAB⁺) *m/z* (%) 591 (30) [C₃₆H₃₈N₄O₄ + H]⁺. IR (ATR, cm^{−1}): ν -NH 3039, ν_{as} -CH₃ 2913, ν_s -CH₃ 2852, ν -C=O (ester) 1731. UV–vis (DMSO, λ_{max} nm) (log ϵ): λ_1 (Soret) 406 (4.48), λ_2 (Q_{IV}) 506 (4.43), λ_3 (Q_{III}) 540 (3.33), λ_4 (Q_{II}) 576 (3.12), λ_5 (Q_I) 630 (2.97). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): −3.84 (s, 2H, NH); 3.27 (t, 4H, ³J = 7.75, H-22 and H-25); 3.59, 3.60, 3.67, and 3.68 (4s, 18 H, H-17, H-18, H-19, H-20, O-CH₃ and O-CH₃); 4.38 (t, 4H, ³J = 7.71, H-21 and H-24); 6.18 (dd, 2H, *J*_{AB} = 1.06, *J*_{AX} = 11.57, H_A); 6.36 (dd, 2H, *J*_{BA} = 1.05 Hz, *J*_{BX} = 17.74 Hz, H_B); 8.25 (m, 2H, H_X); 9.97, 10, 10.11, and 10.13 (4s, 4H, H- α , H- β , H- γ and H- δ). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): 11.81, 12.84, 21.96, 37.06, 51.89, 96.19,

97.18, 97.50, 98.10, 120.90, 130.42, 173.73. The atoms were numbered according to Scheme 1.

Porphyrin 2. The esterification reaction was carried out by adapting a reported procedure.³⁸

A solution of 2.0 mL of benzyl alcohol and 0.5 mL of 1.0 N HCl was cooled to −20 °C in a cold bath, and 70 mg (0.115 mmol) of the disodium salt of the protoporphyrin IX (Na₂-PpIX) was added. The reaction mixture was stirred overnight at −18 °C in the dark. The solution was neutralized with a 10% aqueous solution of NaHCO₃, and the organic phase was extracted with 100 mL of CHCl₃ and dried over Na₂SO₄. The solvent was evaporated to dryness under vacuum, and the crude solid was purified by column chromatography (silica gel, (6/4) ethyl acetate/dichloromethane) to give 76 mg of a purple solid in 89% yield. The purity observed by HPLC is >99%.

MS (FAB⁺) *m/z* (%) 743 (15) [C₄₈H₄₆N₄O₄ + H]⁺. IR (ATR, cm^{−1}): ν -NH 3306, ν_{as} -CH₃ 2909, ν_s -CH₃ 2854, ν -C=O (ester) 1735. UV–vis (DMSO, λ_{max} nm) (log ϵ): λ_1 (Soret) 408 (4.76), λ_2 (Q_{IV}) 506 (3.87), λ_3 (Q_{III}) 540 (3.77), λ_4 (Q_{II}) 576 (3.56), λ_5 (Q_I) 630 (3.41). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): −3.87 (s, 2H, NH); 3.30 (t, 4H, ³J = 7.55, H-22 and H-25); 3.55 and 3.67 (2s, 12 H, H-17, H-18, H-19 and H-20); 4.38 (t, 4H, ³J = 7.51, H-21 and H-24); 5.04 (s, 4H, Ph-CH₂); 6.18 (dd, 2H, *J*_{AB} = 1.01, *J*_{AX} = 11.56, H_A); 6.37 (dd, 2H, *J*_{BA} = 1.68, *J*_{BX} = 17.80, H_B); 7.03 (m, 10H, Ph-H); 8.25 (dd, 2H, *J*_{XA} = 11.44, *J*_{XB} = 17.17, H_X); 9.96, 9.97, 10.07, and 10.13 (4s, 4H, H- α , H- β , H- γ and H- δ). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): 11.83, 12.87, 21.94, 37.18, 66.51, 96.37, 97.25, 97.56, 98.11, 120.93, 128.07, 128.14, 128.41, 130.44, 135.84, 173.14. The atoms were numbered according to Scheme 1.

Synthesis of Chlorin Derivatives. The Diels–Alder reaction was carried out by modifying a reported procedure.^{39,40} Dimethyl acetylenedicarboxylate (1.0 mL, 0.008 mol) was added to a solution of 100 mg of the porphyrin 1 or 2 in 5 mL of chloroform. The reaction mixture was heated to reflux temperature for 72 h with constant stirring. The reaction was concentrated under vacuum, and the two isomers were separated by silica gel chromatography using dichloromethane/hexane/ethyl acetate as eluent (8:1.2:0.8).

Chlorin 3A. Dark blue solid, 19 mg, 21% yield. The purity observed by HPLC is >99%. MS (ESI) *m/z* 733 [C₄₂H₄₄N₄O₈+H]⁺. IR (ATR, cm^{−1}): ν -NH 3334, ν_{as} -CH₃ 2948, ν_s -CH₃ 2856, ν -C=O (ester) 1721. UV–vis (DMSO, λ_{max} nm) (log ϵ): λ_1 (Soret) 406 (4.92), λ_2 (Q_{IV}) 502 (4.05), λ_3 (Q_{III}) 536 (3.94), λ_4 (Q_{II}) 608 (3.60), λ_5 (Q_I) 666 (4.51). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): −2.63 (s, 2H, NH); 2.11 (s, 3H, H-18); 3.26 (t, 2H, *J* = 7.79, H-25); 3.24 (t, 2H, *J* = 7.85, H-22); 3.37 (s, 3H, H-19); 3.52 (a, 3H, H-20); 3.54 (s, 3H, H-17); 3.60 (dd, 1H, *J* = 1.90, H-28); 3.68 (s, 3H, O-CH₃); 3.69 (s, 3H, O-CH₃); 3.93 (s, 3H, H-31); 4.02 (dd, 1H, *J* = 6.67, H-28); 4.07 (s, 3H, H-32); 4.16 (t, 2H, *J* = 7.61, H-24); 4.36 (t, 2H, *J* = 7.23, H-21); 6.14 (dd, 1H, *J*_{AB} = 1.46, *J*_{AX} = 11.51, H_A); 6.32 (dd, 1H, *J*_{BA} = 1.43, *J*_{BX} = 17.84, H_B); 7.39 (dd, 1H, *J* = 1.97, *J* = 6.61, H-27); 8.11 (dd, 1H, *J*_{XA} = 11.49, *J*_{XB} = 17.79, H_X); 9.13 (s, 1H, H- δ); 9.34 (s, 1H, H- α); 9.74 (s, 1H, H- γ); 9.76 (s, 1H, H- β). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): 11.54, 11.73, 12.40, 21.71, 21.95, 28.33, 29.95, 36.78, 37.17, 51.82, 51.93, 52.57, 52.73, 54.93, 90.54, 92.44; 99.03, 99.49, 118.39, 121.63, 128.77, 129.76, 129.86, 130.58, 133.19, 133.22, 134.16, 136.26, 137.28, 138.08, 138.26, 140.05, 149.25, 149.35, 150.56, 151.93, 152.22, 162.39, 166.21, 170.28, 173.52, 173.90. The atoms were numbered according to Scheme 1.

Chlorin 3B. Brown solid, 61 mg, 68% yield. The purity observed by HPLC is >99%. MS (ESI) *m/z* 733 [C₄₂H₄₄N₄O₈+H]⁺. IR (ATR, cm^{−1}): ν -NH 3339, ν_{as} -CH₃ 2957, ν_s -CH₃ 2854, ν -C=O (ester) 1717. UV–vis (DMSO, λ_{max} nm) (log ϵ): λ_1 (Soret) 404 (5.03), λ_2 (Q_{IV}) 500 (4.07), λ_3 (Q_{III}) 534 (3.93), λ_4 (Q_{II}) 608 (3.62), λ_5 (Q_I) 666 (4.55). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): −2.48 (s, 2H, NH); 2.11 (s, 3H, H-18); 3.20 (2 t, superimposed, 4H; H-22 and H-25); 3.42 (s, 3H, H-20); 3.49 (s, 3H, H-17); 3.62 (dd, 1H, *J* = 1.88, *J* = 21.03, H-28); 3.66 (s, 6H, O-CH₃); 3.67 (s, 3H, H-19); 3.91 (s, 3H, H-31); 3.98 (dd, 1H, *J* = 6.68, *J* = 21.07, H-28); 4.01 (s, 3H, H-32); 4.17 (t, 2H, ³J = 7.54, H-21); 4.31 (t, 2H, ³J = 7.57, H-24); 6.17 (dd, 1H, *J*_{AX} = 11.62, H_A); 6.34 (dd, 1H, *J*_{BX} = 17.78, H_B); 7.39 (dd, 1H, ³J = 6.37, H-27); 8.18 (dd, 1H; *J*_{XA} = 11.55, *J*_{XB} = 17.79, H_X); 9.22 (s, 1H; H-

α); 9.31 (s, 1H, H- β); 9.66 (s, 1H, H- γ); 9.80 (s, 1H, H- δ). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): 11.43, 11.80, 12.78, 21.67, 28.33, 29.96, 36.74, 37.17, 51.83, 51.92, 52.71, 52.75, 54.82, 90.11, 92.77, 98.25, 100.42, 118.77, 120.87, 128.52, 129.72, 130.77, 131.10, 133.28, 133.32, 134.14, 136.51, 136.90, 138.25, 138.52, 139.75, 149.31, 149.39, 151.03, 151.27, 153.03, 162.31, 166.19, 170.21, 173.50, 173.92. The atoms were numbered according to Scheme 1.

Chlorin 4A. Dark blue solid, 7 mg, 19% yield. The purity observed by HPLC is >99%. MS (ESI) m/z 885 $[\text{C}_{54}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_8 + \text{H}]^+$. IR (ATR, cm^{-1}): ν -NH 3341, $\nu_{\text{as}}\text{-CH}_3$ 2953, $\nu_{\text{s}}\text{-CH}_3$ 2850, $\nu\text{-C=O}$ (ester) 1718. UV-vis (DMSO, λ_{max} nm) (log ϵ): λ_1 (Soret) 406 (5.01), λ_2 (Q_{IV}) 502 (3.97), λ_3 (Q_{III}) 536 (3.87), λ_4 (Q_{II}) 608 (3.60), λ_5 (Q_{I}) 666 (4.42). ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): -2.58 (s, 2H, NH); 2.11 (s, 3H, H-18); 3.24 (2 t, superimposed, 4H, H-22 and H-25); 3.37 (s, 3H, H-20); 3.48 (s, 3H, H-19); 3.59 (s, 3H, H-17); 3.67 (dd, 1H, J = 1.76, H-28); 3.91 (s, 3H, H-31); 4.00 (dd, 1H, J = 6.76, H-28); 4.01 (s, 3H, H-32); 4.20 (t, 2H, 3J = 7.52, H-21); 4.35 (t, 2H, 3J = 7.61, H-24); 5.04 (s, 4H, Ph- CH_2); 6.17 (dd, 1H, J_{AB} = 1.15, J_{AX} = 11.60, H_{A}); 6.37 (dd, 1H, J_{BA} = 1.46, J_{BX} = 17.87, H_{B}); 7.06 (m, 10H, Ph-H); 7.41 (dd, 1H, J = 1.75, J = 6.42, H-27); 8.18 (dd, 1H, J_{XA} = 11.52, J_{XB} = 17.73, H_{X}); 9.09 (s, 1H, H- δ); 9.39 (s, 1H, H- α); 9.77 (s, 1H, H- γ); 9.82 (s, 1H, H- β). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): 11.45, 11.81, 12.79, 21.65, 21.97, 28.32, 29.97, 36.88, 37.30, 52.72, 52.76, 54.82, 66.43, 66.55, 90.15, 92.74, 98.42, 100.47, 118.73, 120.86, 124.95, 128.05, 128.53, 129.75, 130.74, 131.18, 133.25, 133.31, 134.19, 136.23, 136.88, 138.25, 138.62, 139.74, 149.34, 149.41, 151.05, 151.36, 153.00, 162.28, 166.21, 170.23, 172.94, 173.35. The atoms were numbered according to Scheme 1.

Chlorin 4B. Brown solid, 17 mg, 44% yield. The purity observed by HPLC is >99%. MS (ESI) m/z 885 $[\text{C}_{54}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_8 + \text{H}]^+$. IR (ATR, cm^{-1}): ν -NH 3341, $\nu_{\text{as}}\text{-CH}_3$ 2923, $\nu_{\text{s}}\text{-CH}_3$ 2852, $\nu\text{-C=O}$ (ester) 1719. UV-vis (DMSO, λ_{max} nm) (log ϵ): λ_1 (Soret) 406 (4.99), λ_2 (Q_{IV}) 502 (4.10), λ_3 (Q_{III}) 534 (3.94), λ_4 (Q_{II}) 608 (3.60), λ_5 (Q_{I}) 666 (4.59). ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): -2.55 (s, 2H, NH); 2.04 (s, 3H, H-18); 3.15 (2 t, superimposed, 4H, H-22 and H-25); 3.31 (s, 3H, H-20); 3.37 (s, 3H, H-19); 3.55 (dd, 1H, J = 1.97, H-28); 3.59 (s, 3H, H-17); 3.82 (s, 3H, H-31); 3.90 (dd, 1H, J = 6.66, J = 22.15, H-28); 3.94 (s, 3H, H-32); 4.11 (t, 2H, 3J = 7.52, H-21); 4.24 (t, 2H, 3J = 7.61, H-24); 4.94 (s, 2H, Ph- CH_2); 4.97 (s, 2H, Ph- CH_2); 6.10 (dd, 1H, J_{AB} = 1.43, J_{AX} = 11.54, H_{A}); 6.26 (dd, 1H, J_{BA} = 1.43, J_{BX} = 17.88, H_{B}); 6.95-7.07 (m, 10H, Ph-H); 7.31 (dd, 1H, J = 2.01, J = 6.68, H-27); 8.11 (dd, 1H, J_{XA} = 11.57, J_{XB} = 17.84, H_{X}); 9.15 (s, 1H, H- α); 9.21 (s, 1H, H- β); 9.60 (s, 1H, H- γ); 9.71 (s, 1H, H- δ). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): 11.45, 11.81, 12.79, 21.65, 21.97, 28.32, 29.97, 36.88, 37.30, 52.72, 52.76, 54.82, 66.43, 66.55, 90.15, 92.74, 98.42, 100.47, 118.73, 120.86, 124.95, 128.05, 128.53, 129.75, 130.74, 131.18, 133.25, 133.31, 134.19, 136.23, 136.88, 138.25, 138.62, 139.74, 149.34, 149.41, 151.05, 151.36, 153.00, 162.28, 166.21, 170.23, 172.94, 173.35. The atoms were numbered according to Scheme 1.

Synthesis of the Complexes. General Procedure. The ruthenium complexes were prepared by adapting a reported procedure.⁴¹ A solution of 1.0 mmol of the corresponding ligand (**1**, **2**, **3A**, and **3B**) and 1.1 mmol of $[\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}]$ in 10 mL of benzene was stirred at reflux temperature for 24 h in the dark. The solvent was evaporated to dryness under vacuum, and the crude solid was purified through column chromatography on neutral alumina using a 1:2 hexane/acetone mixture as eluent.

Ru-1: A pink solid was obtained from 30.0 mg (0.051 mmol) of **1** and 36.0 mg (0.056 mmol) of $[\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}]$ in 78% yield (28 mg). The purity observed by HPLC is >99%. MS (FAB⁺) m/z 718 $[\text{C}_{37}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_5\text{Ru} + \text{H}]^+$. IR (ATR, cm^{-1}): $\nu_{\text{as}}\text{-CH}_3$ 2921, $\nu_{\text{s}}\text{-CH}_3$ 2858, $\nu\text{-Ru-C=O}$ 1914, $\nu\text{-C=O}$ (ester) 1744. UV-vis (DMSO, λ_{max} nm) (log ϵ): λ_1 (Soret) 404 (4.76), λ_2 (Q_{B}) 524 (4.08), λ_3 (Q_{A}) 558 (4.27). ^1H NMR (CD_3CN , 500 MHz): 3.30 (t, 4H, H-22 and H-25); 3.57, 3.59, 3.60, 3.61, 3.70, and 3.71 (6s, 18H, H-17, H-18, H-19, H-20, O- CH_3 and O- CH_3); 4.33 (t, 4H, H-21 and H-24); 6.11 (dd, 2H, J_{AB} = 1.52, J_{AX} = 11.51, H_{A}); 6.40 (dd, 2H, J_{BA} = 1.49, J_{BX} = 17.82, H_{B}); 8.38 (m, 2H, J_{XA} = 11.47, J_{XB} = 17.85, H_{X}); 9.94, 10.06, 10.10, 10.17 (4s, 4H, H- α , H- β , H- γ and H- δ). ^{13}C NMR (CD_3CN , 125

MHz): 11.72, 12.94, 14.32, 22.38, 23.29, 30.83, 32.26, 37.56, 52.06, 99.34, 100.01, 100.21, 100.67, 119.87, 174.46, 207.46 (Ru-CO). The atoms were numbered according to Scheme 2.

Ru-2: A pink solid was obtained from 30.0 mg (0.041 mmol) of **2** and 28.0 mg (0.044 mmol) of $[\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}]$ in 61% yield (21 mg). The purity observed by HPLC is >99%. MS (ESI) m/z (%) 872 $[\text{C}_{37}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_5\text{Ru} + 2\text{H}]^+$. IR (ATR, cm^{-1}): $\nu_{\text{as}}\text{-CH}_3$ 2922, $\nu_{\text{s}}\text{-CH}_3$ 2859, $\nu\text{-Ru-C=O}$ 1915, $\nu\text{-C=O}$ (ester) 1729. UV-vis (DMSO, λ_{max} nm) (log ϵ): λ_1 (Soret) 402 (4.76), λ_2 (Q_{B}) 524 (4.08), λ_3 (Q_{A}) 558 (4.11). ^1H NMR (CD_3CN , 500 MHz): 3.36 (t, 4H, H-22 and H-25); 3.52, 3.55, 3.70, and 3.71 (4s, 12H, H-17, H-18, H-19 and H-20); 4.34 (t, 4H, H-21 and H-24); 5.05 (s, 4H, Ph- CH_2); 6.11 (dd, 2H, J_{AB} = 1.72, J_{AX} = 11.54, H_{A}); 6.40 (dd, 2H, J_{BA} = 1.78, J_{BX} = 17.89, H_{B}); 7.13 (m, 10H, Ph-H); 8.40 (dd, 2H, J_{XA} = 11.75, J_{XB} = 17.58, H_{X}); 9.98, 10.04, 10.08, and 10.17 (4s, 4H, H- α , H- β , H- γ and H- δ). ^{13}C NMR (CD_3CN , 125 MHz): 11.58, 11.79, 18.07, 20.26, 22.52, 29.70, 37.87, 37.93, 66.78, 99.18, 99.36, 99.39, 99.52, 128.58, 128.70, 128.79, 129.29, 129.32, 131.32, 131.42, 136.81, 136.91, 137.47, 138.04, 138.06, 140.02, 140.05, 142.01, 142.34, 142.57, 143.02, 143.05, 143.31, 143.36, 143.91, 144.02, 174.01, 211.04 (Ru-CO). The atoms were numbered according to Scheme 2.

Ru-3A: A green solid was obtained from 30.0 mg (0.041 mmol) of **3A** and 29.0 mg (0.045 mmol) of $[\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}]$ in 13% yield (4 mg). The purity observed by HPLC is >98%. MS (ESI) m/z (%) 862 $[\text{C}_{43}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_9\text{Ru} + 2\text{H}]^+$. IR (ATR, cm^{-1}): $\nu_{\text{as}}\text{-CH}_3$ 2992, $\nu_{\text{s}}\text{-CH}_3$ 2854, $\nu\text{-Ru-C=O}$ 1927, $\nu\text{-C=O}$ (ester) 1722. UV-vis (DMSO, λ_{max} nm) (log ϵ): λ_1 (Soret) 406 (4.83), λ_2 (Q_{B}) 536 (3.81), λ_3 (Q_{A}) 568 (3.94), λ_4 (Q_{C}) 606 (4.24). ^1H RMN (acetone- d_6 , 300 MHz): 2.83 (s, 3H, H-18); 3.14 (t, 2H, H-22); 3.26 (t, 2H, H-25); 3.31 (s, 3H, H-19); 3.55 (s, 3H, H-20); 3.56 (s, 3H, H-17) 3.57 (dd, 1H, J = 2.39, H-28); 3.61 (s, 3H, O- CH_3); 3.62 (s, 3H, O- CH_3); 3.66 (dd, 1H, J = 7.59, H-28); 3.90 (s, 3H, H-31); 4.08 (s, 3H, H-32); 4.11 (t, 2H, H-24); 4.37 (t, 2H, H-21); 6.14 (dd, 1H, J_{AB} = 1.58, J_{AX} = 11.62, H_{A}); 6.37 (dd, 1H, J_{BA} = 1.63, J_{BX} = 17.91, H_{B}); 7.65 (dd, 1H, J = 2.30, H-27), 8.23 (dd, 1H, J_{XA} = 11.67, J_{XB} = 17.88, H_{X}); 9.20 (s, 1H, H- δ); 9.55 (s, 1H, H- α); 9.77 (s, 1H, H- γ); 9.91 (s, 1H, H- β). ^{13}C NMR (acetone- d_6 , 75 MHz): 11.43, 11.50, 12.35, 21.97, 22.17, 37.04, 37.47, 51.69, 51.80, 52.00, 52.79, 91.49, 93.15, 99.95, 100.39, 120.57, 121.95, 127.14, 130.47, 137.91, 141.39, 143.33, 149.10, 149.49, 151.67, 152.00, 152.75, 163.53, 166.63, 173.68, 173.87. The atoms were numbered according to Scheme 2.

Ru-3B: A green solid was obtained from 30.0 mg (0.041 mmol) of **3B** and 29.0 mg (0.045 mmol) of $[\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}]$ in 16% yield (6 mg). The purity observed by HPLC is >98%. MS (ESI) m/z (%) 862 $[\text{C}_{43}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_9\text{Ru} + 2\text{H}]^+$. IR (ATR, cm^{-1}): $\nu_{\text{as}}\text{-CH}_3$ 2923, $\nu_{\text{s}}\text{-CH}_3$ 2857, $\nu\text{-Ru-C=O}$ 1923, $\nu\text{-C=O}$ (ester) 1721. UV-vis (DMSO, λ_{max} nm) (log ϵ): λ_1 (Soret) 406 (4.63), λ_2 (Q_{B}) 534 (3.66), λ_3 (Q_{A}) 568 (3.83), λ_4 (Q_{C}) 606 (4.02). ^1H NMR (acetone- d_6 , 300 MHz): 2.79 (s, 3H, H-18); 3.17 (t, 2H, H-22); 3.25 (t, 2H, H-25); 3.42 (s, 3H, H-20); 3.54 (s, 3H, H-17); 3.60 (s, 3H, O- CH_3); 3.61 (s, 3H, O- CH_3); 3.68 (s, 3H, H-19); 3.76 (d, 1H, H-28) 3.88 (s, 3H, H-31); 4.00 (d, 1H, H-28); 4.03 (s, 3H, H-32); 4.16 (t, 2H); 4.34 (t, 2H); 6.21 (dd, 1H, J_{AB} = 1.447, J_{AX} = 11.586, H_{A}); 6.39 (dd, 1H, J_{BA} = 1.466, J_{BX} = 17.892, H_{B}); 7.68 (dd, 1H, 3J = 6.775, H-27); 8.21 (dd, 1H, J_{XA} = 11.603, J_{XB} = 17.852, H_{X}); 9.31 (s, 1H, H- α); 9.55 (s, 1H, H- β); 9.87 (s, 1H, H- γ); 9.95 (s, 1H, H- δ). ^{13}C NMR (acetone- d_6 , 75 MHz): 11.15, 11.49, 12.52, 21.84, 22.14, 36.92, 37.42, 51.69, 51.78, 52.79, 52.92, 55.07, 90.98, 93.37, 99.35, 101.34, 120.89, 121.36, 130.02, 130.36, 137.01, 137.92, 139.05, 139.39, 149.55, 151.84, 152.45, 154.25, 163.23, 166.61, 170.32, 173.63, 173.88. The atoms were numbered according to Scheme 2.

Crystallography. Single crystals suitable for X-ray diffraction were obtained for **3B** and **Ru-1** by slow evaporation of dichloromethane/hexane solution. Data were collected at room temperature (298 K) on a Bruker Apex-II CCD diffractometer using monochromatic graphite Mo $K\alpha$ (0.71073 Å) radiation. Cell determination and final cell parameters were obtained on all reflections using the Bruker SAINT software included in the APEX2 software.^{87,88} The integration and scaling of the data were carried out using the Bruker SAINT software.^{87,88} For compound **3B**, weak high-angle diffractions,

combined with the multiple contents and some degree of disorder, caused a large number of refined parameters with poor data/parameters ratio, which led to the observed low C–C precision. However, the identity of the structure was clearly established without issue. The CIF files have been deposited in the Cambridge Structural Data Base under CCDC 2400652 for **3B** and 2400653 for **Ru-1**. Copies of the data can be obtained, free of charge, at www.ccdc.cam.ac.uk.

Stability Studies. Stability studies were performed using a Shimadzu 2600 UV–vis spectrophotometer at 37 °C from 1×10^{-5} M solutions of each compound in pure DMSO or in PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Dominique Dutscher SAS without magnesium and calcium) with 0.1% DMSO. Spectra were recorded every hour for 24 h in DMSO and every hour for 8 h in PBS/DMSO (0.1%).

Photostability Studies. The photodegradation of the new compounds was evaluated as described in the literature.⁴⁶ Solutions of each compound at a concentration of 1×10^{-5} M were prepared in pure DMSO or in PBS/DMSO (0.1%). Each solution was irradiated at 37 °C with white light (light temperature: 8500 K and light intensity: 50%, SmallRing brand) at different times until completing 15 min (irradiation time: 0, 3, 6, 9, 12, and 15 min). The absorption spectrum was recorded after each irradiation.

EPR Studies. The detection of singlet oxygen is based on the specific reaction between $^1\text{O}_2$ and 2,2,6,6-tetramethylpiperidine (TEMP), which produces a stable (2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl (TEMPO) radical adduct. Detection of $^1\text{O}_2$ was carried out according to the following procedure. Solutions of 1×10^{-3} M of the compounds and 0.06 M TEMP in ethanol/DMSO (1%, final volume 400 μL) equilibrated with air at room temperature were irradiated with visible light in a flat cell for up to 15 min, generating the characteristic triplet signal corresponding to TEMPO. EPR spectra were obtained with the following parameters: center field, 334.5 ± 4 mT; power, 1.0 mW; microwave frequency, 9.43 GHz; modulation width, 0.5 mT; time constant, 0.1 s; amplitude, 10. The oxygen concentration was measured using an Iuzmar dissolved oxygen meter. For the detection of superoxide radical ($\text{O}_2^{\bullet-}$), 5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO, from Dojindo Japan) was used. Detection of $\text{O}_2^{\bullet-}$ was carried out according to the following procedure. A mixture of 1×10^{-3} M solution of the compounds and a 0.07 M solution of DMPO in methanol/DMSO (1%, final volume 400 μL) at room temperature were irradiated with visible light in a flat cell for up to 15 min, generating the signal of the DMPO- $\text{O}_2^{\bullet-}$ adduct. EPR spectra were obtained with the following parameters: center field, 335 ± 4 mT; power, 8.0 mW; microwave frequency, 9.43 GHz; modulation width, 0.63 mT; time constant, 0.1 s; amplitude, 100.

Fluorescence Quantum Yield Measurements. The fluorescence quantum yields were determined using verteporfin in DMSO as a reference ($\Phi_f = 0.0085$).^{46,89} The free ligands were excited at 503 nm, and the ruthenium complexes at 573 nm. The quantum yield was calculated following eq 1.^{90,91}

$$\Phi_f = \Phi_{\text{ST}} \left(\frac{\text{grad}_X}{\text{grad}_{\text{ST}}} \right) \left(\frac{\eta_X^2}{\eta_{\text{ST}}^2} \right) \quad (1)$$

Where ST and X are standard and analyte, respectively, Φ_f is the fluorescence quantum yield, Grad is the gradient from the area of integration fluorescence intensity vs absorbance, and η_X and η_{ST} are the refractive index of the solvent used to measure the fluorescence spectrum of the analyte and the standard, respectively.

Oxygen Singlet Quantum Yield Measurements. Quantum yields of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) production were determined in DMSO equilibrated with oxygen and white light, using verteporfin as a reference and 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) as a chemical trap which in the presence of singlet oxygen is oxidized to 1,2-dibenzoylbenzene.⁹² The absorption band of DPBF was monitored at 214 nm.⁹³ The $^1\text{O}_2$ production quantum yields of the compounds were determined following eq 2.^{94,95}

$$\Phi_{\Delta\text{PS}} = \Phi_{\Delta\text{ref}} \frac{k_{\text{PS}}}{k_{\text{ref}}} \quad (2)$$

Where PS is the photosensitizer, $\Phi_{\Delta\text{ref}}$ is singlet oxygen production quantum yield of verteporfin ($\Phi_{\Delta} = 0.77$ in DMSO⁴⁶) and k_{ref} and k_{PS} are the decay constant of DPBF in the presence of the standard (VP) or each PS and are obtained from the slope obtained from the absorbance of DPBF at different irradiation times.

Lipophilicity Studies. The partition coefficient ($\log P_{\text{o/PBS}}$) of each compound was determined experimentally by the “shake-flask” method at room temperature following reported methods.^{57,96} A mixture of 1-octanol and PBS in equal amounts was shaken for 24 h, after which the phases were allowed to separate for 24 h. Then, a 1×10^{-5} M solution of each compound is prepared in 1-octanol/PBS (1:1), and the mixture is left to stir for 24 h. After 24 h of stirring, the mixture is left for 24 h to separate the two phases. Finally, the concentration of each compound in the two phases is determined by UV–vis spectroscopy. $\log P$ was determined by the following eq 3.⁹⁷

$$\log P = \log \left(\frac{A_{\text{ap}}}{A_{\text{bp}} - A_{\text{ap}}} \right) \quad (3)$$

Where A_{ap} is the absorbance after partition, and A_{bp} is the absorbance before partition.

Biology. Cell Lines. The human gastric adenocarcinoma (AGS) cell line was acquired from ATCC (Manassas, VA). AGS cells were cultured in RPMI 1640 medium (Roswell Park Memorial Institute) containing 10% fetal bovine serum (FBS) at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO_2 .

MTT Survival Assays. The antiproliferative activity of cancer cells was determined by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Cells were seeded at 10,000 cells per well (200 μL) in Cellstar 96-well plates (Greiner Bio-One) and further incubated for 24 h. Cells were treated with each compound at different concentrations for 8 h in the dark. After this time, the medium was removed, fresh medium was added, and cells were kept in the dark or irradiated with white light for 15 min. Subsequently, the plates were incubated in the dark for an additional 48 h, and the MTT assay was performed as previously described in the literature.³⁴ Measurements were performed at 550 nm with the Tristar2 Multi-mode Reader (Berthold Technologies).

Western Blotting.⁹⁸ AGS cells were treated with the IC_{50} of each compound for 4 h at 37 °C in the dark and then were either kept in the dark or irradiated with white light for 15 min and further cultivated in the dark for an additional 24 h. Cells were then lysed in lysis buffer (50 mM Tris–HCl pH 6.7, NaCl 150 mM, NP40 1%). Total protein concentration was determined using Bradford assay and adjusted to the same quantity (50 μg) for each experiment. A total of 30 μg of proteins were resolved by 6–15% SDS-PAGE (depending on protein molecular weight) and transferred to nitrocellulose blotting membranes according to standard methods. Membranes were blocked with blocking buffer (containing 5% milk powder or 1% BSA) for 1 h at room temperature, then washed three times with TBST or PBST (containing 0.1% Tween-20) and incubated with primary antibodies at 4 °C overnight. The following day, the membranes were washed thrice with PBST or PBST. The membranes were incubated with antirabbit or antimouse antibodies for 1 h at room temperature and visualized by enhanced chemiluminescence using the Clarity™ ECL Western Blotting Substrate Bio-Rad reagent according to the manufacturer's instructions. Signals were acquired with the help of Immobilon Crescendo or Ozyme on Syngene PXi equipment using GeneSys software. Protein bands were quantified using ImageJ software.⁹⁹ Western blots were performed using the following antibodies: GAPDH (6C5) (1:2000, sc-32233, Santa Cruz Biotechnology); Cleaved PARP (D64E10) (1:1000, 5625S, Cell Signaling Technology); COX2 (D5H5) (1:1000, 12282S, Cell Signaling Technology); CHOP/GADD 153 (B-3) (1:500, sc-7351, Santa Cruz Biotechnology); Cleaved Caspase-3 (D175) (1:1000, 9661L, Cell Signaling Technology); GPX4 (1:1000, ab25066, abcam) and LC3B (D11) (1:1000, 3868S, Cell Signaling Technology). The

secondary antibodies were: Antirabbit IgG (1:10000, 7074S, Cell Signaling Technology) and Anti-Mouse IgG (1:8000, 7076S, Cell Signaling Technology). Loading was controlled by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) for normalization.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.inorgchem.5c00896>.

Mass spectra; IR spectra; NMR spectra; UV-vis spectra; EPR spectra and cell survival graphs (Figures S1–S102); crystallographic data and quantum yields (Tables S1 and S2) (PDF)

Accession Codes

Deposition Numbers 2400652–2400653 contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via the joint Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) and Fachinformationszentrum Karlsruhe Access Structures service.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Georg Mellitzer – *Inserm UMR_S U1113; IRFAC, 67200 Strasbourg, France*; Present Address: INSERM, UMR_S1260, Regenerative Nanomedicine; Team GP-SMIT; CRBS, 1 Rue Eugène Boeckel, 67085 Strasbourg, France; Email: mellitzer@unistra.fr

Ronan Le Lagade – *Universidad Nacional Autonoma de México, Instituto de Química UNAM, 04510 Ciudad de México, Mexico*; orcid.org/0000-0002-5679-2081; Email: ronan@unam.mx

Authors

Andrés Restrepo-Acevedo – *Universidad Nacional Autonoma de México, Instituto de Química UNAM, 04510 Ciudad de México, Mexico*

María Isabel Murillo – *Universidad Nacional Autonoma de México, Instituto de Química UNAM, 04510 Ciudad de México, Mexico*

Christophe Orvain – *Inserm UMR_S U1113; IRFAC, 67200 Strasbourg, France*; Present Address: INSERM, UMR_S1260, Regenerative Nanomedicine; Team GP-SMIT; CRBS, 1 Rue Eugène Boeckel, 67085 Strasbourg, France

Chloé Thibaudeau – *Inserm UMR_S U1113; IRFAC, 67200 Strasbourg, France*

Sevda Recberlik – *Inserm UMR_S U1113; IRFAC, 67200 Strasbourg, France*; Present Address: INSERM, UMR_S1260, Regenerative Nanomedicine; Team GP-SMIT; CRBS, 1 Rue Eugène Boeckel, 67085 Strasbourg, France

Lucas Verget – *Universidad Nacional Autonoma de México, Instituto de Química UNAM, 04510 Ciudad de México, Mexico*; *Faculté de Chimie, Sorbonne Université, 75005 Paris, France*

Virginia Gómez Vidales – *Universidad Nacional Autonoma de México, Instituto de Química UNAM, 04510 Ciudad de México, Mexico*

Christian Gaidon – *Inserm UMR_S U1113; IRFAC, 67200 Strasbourg, France*; Present Address: UMR7242, Biotechnology et Signalisation Cellulaire, 300 Boulevard S. Brant, 67412 Illkirch Cedex, France; orcid.org/0000-0003-4315-3851

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.inorgchem.5c00896>

Author Contributions

The manuscript was written with contributions from all authors. All authors have approved the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank the financial support from DGAPA-UNAM (PAPIIT projects IN-211522 and IN207725), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Project A1-S-15068 and grant 996154 to A. Restrepo-Acevedo), ECOS Nord (Project 279063), and the Long Duration National or International Academic Activities program from the General Coordination of Graduate Studies at UNAM. We thank M. P. Orta Perez, A. Romo, L. del Carmen Márquez, E. García Ríos, L. Rios Ruiz, J. D. Vázquez Cuevas, M. M. Aguilar Araiza, G. E. Cortés Romero, and N. Perrusson for obtaining analytical data and for technical assistance. Rubén A. Toscano is thanked for X-ray diffraction crystallographic studies.

■ REFERENCES

- (1) Oluwajembola, A. M.; Cleanclay, W. D.; Onyia, A. F.; Chikere, B. N.; Zakari, S.; Ndifreke, E.; De Campos, O. C. Photosensitizers in photodynamic therapy: An advancement in cancer treatment. *Results Chem.* **2024**, *10*, No. 101715.
- (2) Zhang, Y.; Doan, B. T.; Gasser, G. Metal-Based Photosensitizers as Inducers of Regulated Cell Death Mechanisms. *Chem. Rev.* **2023**, *123* (16), 10135–10155.
- (3) Alderden, R. A.; Hall, M. D.; Hambley, T. W. The Discovery and Development of Cisplatin. *J. Chem. Educ.* **2006**, *83* (5), No. 728.
- (4) Johnstone, T. C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S. J. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (5), 3436–3486.
- (5) Kelland, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7* (8), 573–584.
- (6) Florea, A.-M.; Büsselberg, D. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers* **2011**, *3* (1), 1351–1371.
- (7) Klein, A. V.; Hambley, T. W. Platinum Drug Distribution in Cancer Cells and Tumors. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (10), 4911–4920.
- (8) Aebischer, D.; Serafin, I.; Batóg-Szczęch, K.; Dynarowicz, K.; Chodurek, E.; Kawczyk-Krupka, A.; Bartusik-Aebischer, D. Photodynamic Therapy in the Treatment of Cancer—The Selection of Synthetic Photosensitizers. *Pharmaceuticals* **2024**, *17* (7), No. 932.
- (9) Zhang, Y.; Doan, B.-T.; Gasser, G. Metal-Based Photosensitizers as Inducers of Regulated Cell Death Mechanisms. *Chem. Rev.* **2023**, *123* (16), 10135–10155.
- (10) Yin, H.; Stephenson, M.; Gibson, J.; Sampson, E.; Shi, G.; Sainuddin, T.; Monroe, S.; McFarland, S. A. In Vitro Multiwavelength PDT with 3IL States: Teaching Old Molecules New Tricks. *Inorg. Chem.* **2014**, *53* (9), 4548–4559.
- (11) Gunaydin, G.; Gedik, M. E.; Ayan, S. Photodynamic Therapy—Current Limitations and Novel Approaches. *Front. Chem.* **2021**, *9*, No. 691697.
- (12) Correia, J. H.; Rodrigues, J. A.; Pimenta, S.; Dong, T.; Yang, Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics* **2021**, *13* (9), No. 1332.
- (13) Wu, Y.; Li, S.; Chen, Y.; He, W.; Guo, Z. Recent advances in noble metal complex based photodynamic therapy. *Chem. Sci.* **2022**, *13* (18), 5085–5106.

- (14) Juarranz, Á.; Jaén, P.; Sanz-Rodríguez, F.; Cuevas, J.; González, S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin. Transl. Oncol.* **2008**, *10* (3), 148–154.
- (15) Simões, J. C. S.; Sarpaki, S.; Papadimitroulas, P.; Therrien, B.; Loudos, G. Conjugated Photosensitizers for Imaging and PDT in Cancer Research. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (23), 14119–14150.
- (16) Sun, B.; Bte Rahmat, J. N.; Zhang, Y. Advanced techniques for performing photodynamic therapy in deep-seated tissues. *Biomaterials* **2022**, *291*, No. 121875.
- (17) Yoon, I.; Li, J. Z.; Shim, Y. K. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clinical Endoscopy* **2013**, *46* (1), 7–23.
- (18) Dąbrowski, J. M.; Pucelik, B.; Regiel-Futyra, A.; Brindell, M.; Mazuryk, O.; Kyzioł, A.; Stochel, G.; Macyk, W.; Arnaut, L. G. Engineering of relevant photodynamic processes through structural modifications of metallotetrapyrrolic photosensitizers. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *325*, 67–101.
- (19) Otvagin, V. F.; Kuzmina, N. S.; Kudriashova, E. S.; Nyuchev, A. V.; Gavryushin, A. E.; Fedorov, A. Y. Conjugates of Porphyrinoid-Based Photosensitizers with Cytotoxic Drugs: Current Progress and Future Directions toward Selective Photodynamic Therapy. *J. Med. Chem.* **2022**, *65* (3), 1695–1734.
- (20) Xue, Q.; Zhang, J.; Jiao, J.; Qin, W.; Yang, X. Photodynamic therapy for prostate cancer: Recent advances, challenges and opportunities. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, No. 980239.
- (21) Mukherjee, R. A Comprehensive Review for Ruthenium(II) Complexes in Photodynamic Therapy. *Asian J. Chem.* **2023**, *35* (11), 2595–2602.
- (22) Pozza, M. D.; Mesdom, P.; Abdullrahman, A.; Otoy, T. D. P.; Arnoux, P.; Frochot, C.; Niogret, G.; Saubamea, B.; Burckel, P.; Hall, J. P.; Hollenstein, M.; Cardin, C. J.; Gasser, G. Increasing the pi-Expansive Ligands in Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes: Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation for Photodynamic Therapy Applications. *Inorg. Chem.* **2023**, *62* (45), 18510–18523.
- (23) Monro, S.; Colon, K. L.; Yin, H.; Roque, J., 3rd; Konda, P.; Gujar, S.; Thummel, R. P.; Lilge, L.; Cameron, C. G.; McFarland, S. A. Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (2), 797–828.
- (24) Gianferrara, T.; Bergamo, A.; Bratsos, I.; Milani, B.; Spagnul, C.; Sava, G.; Alessio, E. Ruthenium–Porphyrin Conjugates with Cytotoxic and Phototoxic Antitumor Activity. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (12), 4678–4690.
- (25) Vizzotto, B. S.; Dias, R. S.; Iglesias, B. A.; Krause, L. F.; Viana, A. R.; Schuch, A. P. DNA photocleavage and melanoma cells cytotoxicity induced by a meso-tetra-ruthenated porphyrin under visible light irradiation. *J. Photochem. Photobiol., B* **2020**, *209*, No. 111922.
- (26) Ge, J.; Lan, M.; Zhou, B.; Liu, W.; Guo, L.; Wang, H.; Jia, Q.; Niu, G.; Huang, X.; Zhou, H.; Meng, X.; Wang, P.; Lee, C.-S.; Zhang, W.; Han, X. A graphene quantum dot photodynamic therapy agent with high singlet oxygen generation. *Nat. Commun.* **2014**, *5* (1), No. 4596.
- (27) Amselem, L.; Monés, J. M.; Arias, L. Photosensitizers and Photodynamic Therapy: Verteporfin. In *Retinal Pharmacotherapy*; Nguyen, Q. D.; Rodrigues, E. B.; Farah, M. E.; Mieler, W. F., Eds.; W.B. Saunders, 2010; Chapter 43, pp 297–305.
- (28) Gibault, F.; Bailly, F.; Corvaisier, M.; Coevoet, M.; Huet, G.; Melnyk, P.; Cotellet, P. Molecular Features of the YAP Inhibitor Verteporfin: Synthesis of Hexasubstituted Dipyrroles as Potential Inhibitors of YAP/TAZ, the Downstream Effectors of the Hippo Pathway. *ChemMedChem* **2017**, *12* (12), 954–961.
- (29) Houle, J. M.; Strong, H. A. Duration of skin photosensitivity and incidence of photosensitivity reactions after administration of verteporfin. *Retina* **2002**, *22* (6), 691–697.
- (30) Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Ca-Cancer J. Clin.* **2021**, *71* (3), 209–249.
- (31) Mihmanli, M.; Ilhan, E.; Idiz, U. O.; Alemdar, A.; Demir, U. Recent developments and innovations in gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22* (17), 4307–4320.
- (32) Han, K. H.; Choi, Y. J.; Il Kim, T.; Park, N. H.; Han, K.-d.; Lee, D. H. Association between glycemic status and the risk of gastric cancer in pre/peri- and postmenopausal women: A nationwide cohort study. *Ann. Epidemiol.* **2024**, *94*, 106–112.
- (33) Li, Z.; Shu, X.; Liu, X.; Li, Q.; Hu, Y.; Jia, B.; Song, M. Cellular and Molecular Mechanisms of Chemoresistance for Gastric Cancer. *Int. J. Gen. Med.* **2024**, *17*, 3779–3788.
- (34) Blanchet, A.; Bourgmayer, A.; Kurtz, J.-E.; Mellitzer, G.; Gaiddon, C. Isoforms of the p53 Family and Gastric Cancer: A Ménage à Trois for an Unfinished Affair. *Cancers* **2021**, *13* (4), No. 916.
- (35) Vidimar, V.; Meng, X.; Klajner, M.; Licona, C.; Fetzter, L.; Harlepp, S.; Hebraud, P.; Sidhoum, M.; Sirlin, C.; Loeffler, J. P.; Mellitzer, G.; Sava, G.; Pfeffer, M.; Gaiddon, C. Induction of caspase 8 and reactive oxygen species by ruthenium-derived anticancer compounds with improved water solubility and cytotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *84* (11), 1428–1436.
- (36) Vidimar, V.; Licona, C.; Cerón-Camacho, R.; Guerin, E.; Coliat, P.; Venkatasamy, A.; Ali, M.; Guenot, D.; Le Lagadec, R.; Jung, A. C.; Freund, J.-N.; Pfeffer, M.; Mellitzer, G.; Sava, G.; Gaiddon, C. A redox ruthenium compound directly targets PHD2 and inhibits the HIF1 pathway to reduce tumor angiogenesis independently of p53. *Cancer Lett.* **2019**, *440–441*, 145–155.
- (37) Riegel, G.; Orvain, C.; Recberlik, S.; Spaety, M. E.; Poschet, G.; Venkatasamy, A.; Yamamoto, M.; Nomura, S.; Tsukamoto, T.; Masson, M.; Gross, I.; Le Lagadec, R.; Mellitzer, G.; Gaiddon, C. The unfolded protein response-glutathione metabolism axis: A novel target of a cycloruthenated complexes bypassing tumor resistance mechanisms. *Cancer Lett.* **2024**, *585*, No. 216671.
- (38) Miyata, K.; Yasuda, S.; Masuya, T.; Ito, S.; Kinoshita, Y.; Tamiaki, H.; Oba, T. Facile iodination of the vinyl groups in protoporphyrin IX dimethyl ester and subsequent transformation of the iodinated moieties. *Tetrahedron* **2018**, *74* (27), 3707–3711.
- (39) Morgan, A. R.; Kohli, D. H. Diels-alder reactions of protoporphyrin IX dimethyl ester. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36* (42), 7603–7606.
- (40) de Oliveira, K. T.; Silva, A. M. S.; Tomé, A. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Neri, C. R.; Garcia, V. S.; Serra, O. A.; Iamamoto, Y.; Cavaleiro, J. A. S. Synthesis of new amphiphilic chlorin derivatives from protoporphyrin-IX dimethyl ester. *Tetrahedron* **2008**, *64* (37), 8709–8715.
- (41) Rebouças, J. S.; James, B. R. Ruthenium(II) complexes of meso-tetrakis(4-cyanophenyl)porphyrin. *Inorg. Chem. Commun.* **2013**, *30*, 49–52.
- (42) Chow, B. C.; Cohen, I. A. Derivatives of tetraphenylporphyrin-ruthenium (II). *Bioinorg. Chem.* **1971**, *1* (1), 57–63.
- (43) Thandiyyakone, V.; Murugan, A.; Ravikumar, C. R.; Rajkumar, T.; Arasu, P. T.; Yadav, H. S.; Kotteeswaran, P. Studies on redox and axial ligand properties of Meso-Mn(III) porphyrin by cyclic voltammetry and UV–Visible spectrophotometry. *Mater. Today: Proc.* **2021**, *47*, 933–937.
- (44) Dar, U. A.; Shah, S. A. UV–visible and fluorescence spectroscopic assessment of meso-tetrakis-(4-halophenyl) porphyrin; H2TXPP (X = F, Cl, Br, I) in THF and THF-water system: Effect of pH and aggregation behaviour. *Spectrochim. Acta, Part A* **2020**, *240*, No. 118570.
- (45) Nas, A.; Fandaklı, S.; Kantekin, H.; Demirbaş, A.; Durmuş, M. Novel organosoluble metal-free and metallophthalocyanines bearing triazole moieties: Microwave assisted synthesis and determination of photophysical and photochemical properties. *Dyes Pigm.* **2012**, *95* (1), 8–17.
- (46) Linares, I. A. P.; de Oliveira, K. T.; Perussi, J. R. Chlorin derivatives sterically-prevented from self-aggregation with high

antitumor activity for photodynamic therapy. *Dyes Pigm.* **2017**, *145*, 518–527.

(47) Spiller, W.; Kliesch, H.; Wöhrle, D.; Hackbarth, S.; Röder, B.; Schnurpfeil, G. Singlet oxygen quantum yields of different photosensitizers in polar solvents and micellar solutions. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **1998**, *2* (2), 145–158.

(48) Pan, J.; Jiang, L.; Chan, C.-F.; Tsoi, T.-H.; Shiu, K.-K.; Kwong, D. W. J.; Wong, W.-T.; Wong, W.-K.; Wong, K.-L. Excitation energy transfer in ruthenium (II)-porphyrin conjugates led to enhanced emission quantum yield and $^1\text{O}_2$ generation. *J. Lumin.* **2017**, *184*, 89–95.

(49) McCarthy, J. R.; Weissleder, R. Model Systems for Fluorescence and Singlet Oxygen Quenching by Metalloporphyrins. *ChemMedChem* **2007**, *2* (3), 360–365.

(50) Mani, A.; Feng, T.; Gandioso, A.; Vinck, R.; Notaro, A.; Gourdon, L.; Burckel, P.; Saubaméa, B.; Blacque, O.; Cariou, K.; Belgaied, J.-E.; Chao, H.; Gasser, G. Structurally Simple Osmium(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers for Photodynamic Therapy in the Near Infrared. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2023**, *62* (20), No. e202218347.

(51) Rovira, A.; Ortega-Forte, E.; Hally, C.; Jordà-Redondo, M.; Abad-Montero, D.; Viguera, G.; Martínez, J. I.; Bosch, M.; Nonell, S.; Ruiz, J.; Marchán, V. Exploring Structure–Activity Relationships in Photodynamic Therapy Anticancer Agents Based on Ir(III)-COUPY Conjugates. *J. Med. Chem.* **2023**, *66* (12), 7849–7867.

(52) Buettner, G. R. Spin Trapping: ESR parameters of spin adducts 1474 1528V. *Free Radical Biol. Med.* **1987**, *3* (4), 259–303.

(53) Brahmi, J.; Nasri, S.; Saidi, H.; Nasri, H.; Aouadi, K. Synthesis of New Porphyrin Complexes: Evaluations on Optical, Electrochemical, Electronic Properties and Application as an Optical Sensor. *ChemistrySelect* **2019**, *4* (4), 1350–1359.

(54) Xu, S.; Yuan, Y.; Cai, X.; Zhang, C.-J.; Hu, F.; Liang, J.; Zhang, G.; Zhang, D.; Liu, B. Tuning the singlet-triplet energy gap: a unique approach to efficient photosensitizers with aggregation-induced emission (AIE) characteristics. *Chem. Sci.* **2015**, *6* (10), 5824–5830.

(55) Fukuzumi, S.; Ohkubo, K.; Zheng, X.; Chen, Y.; Pandey, R. K.; Zhan, R.; Kadish, K. M. Metal Bacteriochlorins Which Act as Dual Singlet Oxygen and Superoxide Generators. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (9), 2738–2746.

(56) Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. iLOGP: A Simple, Robust, and Efficient Description of n-Octanol/Water Partition Coefficient for Drug Design Using the GB/SA Approach. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54* (12), 3284–3301.

(57) Stephan, K.; Saab, J.; Mokbel, I.; Goutaudier, C.; Ferrigno, R. Continuous-flow microfluidic method for octanol-water partition coefficient measurement. *Fluid Phase Equilib.* **2014**, *380*, 116–120.

(58) Kim, K.; Park, H.; Lim, K.-M. Phototoxicity: Its Mechanism and Animal Alternative Test Methods. *Toxicol. Res.* **2015**, *31* (2), 97–104.

(59) Heinemann, F.; Karges, J.; Gasser, G. Critical Overview of the Use of Ru(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers in One-Photon and Two-Photon Photodynamic Therapy. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50* (11), 2727–2736.

(60) Liu, X.; Li, G.; Xie, M.; Guo, S.; Zhao, W.; Li, F.; Liu, S.; Zhao, Q. Rational design of type I photosensitizers based on Ru(II) complexes for effective photodynamic therapy under hypoxia. *Dalton Trans.* **2020**, *49* (32), 11192–11200.

(61) Mishchenko, T.; Balalaeva, I.; Gorokhova, A.; Vedunova, M.; Krysko, D. V. Which cell death modality wins the contest for photodynamic therapy of cancer? *Cell Death Dis.* **2022**, *13* (5), No. 455.

(62) Ha, J.-H.; Kim, Y.-J. Photodynamic and Cold Atmospheric Plasma Combination Therapy Using Polymeric Nanoparticles for the Synergistic Treatment of Cervical Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (3), No. 1172.

(63) Brabec, V.; Kasparkova, J. Ruthenium coordination compounds of biological and biomedical significance. DNA binding agents. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *376*, 75–94.

(64) Sudhindra, P.; Sharma, S. A.; Roy, N.; Moharana, P.; Paira, P. Recent advances in cytotoxicity, cellular uptake and mechanism of action of ruthenium metallodrugs: A review. *Polyhedron* **2020**, *192*, No. 114827.

(65) Dorairaj, D. P.; Haribabu, J.; Dharmasivam, M.; Malekshah, R. E.; Subarkhan, M. K. M.; Echeverria, C.; Karvembu, R. Ru(II)-p-Cymene Complexes of Furoylthiourea Ligands for Anticancer Applications against Breast Cancer Cells. *Inorg. Chem.* **2023**, *62* (30), 11761–11774.

(66) Xu, Z.; Li, C.; Zhou, Q.; Deng, Z.; Tong, Z.; Tse, M.-K.; Zhu, G. Synthesis, Cytotoxicity, and Mechanistic Investigation of Platinum-(IV) Anticancer Complexes Conjugated with Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibitors. *Inorg. Chem.* **2019**, *58* (23), 16279–16291.

(67) Chen, X.; Mao, J.; Zhou, L.; Jiang, W.; Li, Z.; Li, Y.; Chen, S.; Tan, G.; Xie, Y.; Wang, C.; Sun, J. Reducing PKC δ inhibits tumor growth through growth hormone by inhibiting PKA/CREB/ERK signaling pathway in pituitary adenoma. *Sci. Rep.* **2025**, *15* (1), No. 11461.

(68) Devarajan, E.; Sahin, A. A.; Chen, J. S.; Krishnamurthy, R. R.; Aggarwal, N.; Brun, A.-M.; Sapino, A.; Zhang, F.; Sharma, D.; Yang, X.-H.; Tora, A. D.; Mehta, K. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene* **2002**, *21* (57), 8843–8851.

(69) Ding, M.; Ma, C.; Lin, Y.; Fang, H.; Xu, Y.; Wang, S.; Chen, Y.; Zhou, J.; Gao, H.; Shan, Y.; Yang, L.; Sun, H.; Tang, Y.; Wu, X.; Zhu, L.; Zheng, L.; Assaraf, Y. G.; Zhou, B.-B. S.; Gu, S.; Li, H. Therapeutic targeting de novo purine biosynthesis driven by β -catenin-dependent PPAT upregulation in hepatoblastoma. *Cell Death Dis.* **2025**, *16* (1), No. 179.

(70) Pan, M.; Zhang, Y.; Wright, W. C.; Liu, X.; Passaia, B.; Currier, D.; Low, J.; Chapple, R. H.; Steele, J. A.; Connelly, J. P.; Ju, B.; Plyler, E.; Lu, M.; Loughran, A. J.; Yang, L.; Abraham, B. J.; Pruett-Miller, S. M.; Freeman, B.; Campbell, G. E.; Dyer, M. A.; Chen, T.; Stewart, E.; Koo, S.; Sheppard, H.; et al. Bone morphogenetic protein (BMP) signaling determines neuroblastoma cell fate and sensitivity to retinoic acid. *Nat. Commun.* **2025**, *16* (1), No. 2036.

(71) Fang, J.; Huang, X.; Yang, Y.; Wang, X.; Liang, X.; Liu, J. Berberine-photodynamic induced apoptosis by activating endoplasmic reticulum stress-autophagy pathway involving CHOP in human malignant melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, *552*, 183–190.

(72) Lee, Y.-S.; Lee, D.-H.; Choudry, H. A.; Bartlett, D. L.; Lee, Y. J. Ferroptosis-Induced Endoplasmic Reticulum Stress: Cross-talk between Ferroptosis and Apoptosis. *Mol. Cancer Res.* **2018**, *16* (7), 1073–1076.

(73) Ochoa, C. D.; Wu, R. F.; Terada, L. S. ROS signaling and ER stress in cardiovascular disease. *Mol. Aspects Med.* **2018**, *63*, 18–29.

(74) Zhao, T.; Wu, K.; Hogstrand, C.; Xu, Y.-H.; Chen, G.-H.; Wei, C.-C.; Luo, Z. Lipophagy mediated carbohydrate-induced changes of lipid metabolism via oxidative stress, endoplasmic reticulum (ER) stress and ChREBP/PPAR γ pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* **2020**, *77* (10), 1987–2003.

(75) Verfaillie, T.; Salazar, M.; Velasco, G.; Agostinis, P. Linking ER Stress to Autophagy: Potential Implications for Cancer Therapy. *Int. J. Cell Biol.* **2010**, *2010* (1), No. 930509.

(76) Song, S.; Tan, J.; Miao, Y.; Li, M.; Zhang, Q. Crosstalk of autophagy and apoptosis: Involvement of the dual role of autophagy under ER stress. *J. Cell. Physiol.* **2017**, *232* (11), 2977–2984.

(77) Kania, E.; Pająk, B.; Orzechowski, A. Calcium Homeostasis and ER Stress in Control of Autophagy in Cancer Cells. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015* (1), No. 352794.

(78) Luo, M.; Li, H.; Han, D.; Yang, K.; Kang, L. Inhibition of autophagy enhances apoptosis induced by Ce6-photodynamic therapy in human colon cancer cells. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2021**, *36*, No. 102605.

(79) Rouschop, K.; Brady, G. W. Regulation of Autophagy Through Multiple Independent Hypoxic Signaling Pathways. *Curr. Mol. Med.* **2009**, *9* (4), 417–424.

- (80) Ouyang, G.; Xiong, L.; Liu, Z.; Lam, B.; Bui, B.; Ma, L.; Chen, X.; Zhou, P.; Wang, K.; Zhang, Z.; Huang, H.; Miao, X.; Chen, W.; Wen, Y. Inhibition of autophagy potentiates the apoptosis-inducing effects of photodynamic therapy on human colon cancer cells. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2018**, *21*, 396–403.
- (81) Sun, Y.; Chen, P.; Zhai, B.; Zhang, M.; Xiang, Y.; Fang, J.; Xu, S.; Gao, Y.; Chen, X.; Sui, X.; Li, G. The emerging role of ferroptosis in inflammation. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *127*, No. 110108.
- (82) Kajarabille, N.; Latunde-Dada, G. O. Programmed Cell-Death by Ferroptosis: Antioxidants as Mitigators. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (19), No. 4968.
- (83) Friedmann Angeli, J. P.; Krysko, D. V.; Conrad, M. Ferroptosis at the crossroads of cancer-acquired drug resistance and immune evasion. *Nat. Rev. Cancer* **2019**, *19* (7), 405–414.
- (84) Gurram, B.; Zhang, S.; Li, M.; Li, H.; Xie, Y.; Cui, H.; Du, J.; Fan, J.; Wang, J.; Peng, X. Celecoxib Conjugated Fluorescent Probe for Identification and Discrimination of Cyclooxygenase-2 Enzyme in Cancer Cells. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (8), 5187–5193.
- (85) Hashemi Goradel, N.; Najafi, M.; Salehi, E.; Farhood, B.; Mortezaee, K. Cyclooxygenase-2 in cancer: A review. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234* (5), 5683–5699.
- (86) Fauré, M.; Saccavini, C.; Lavigne, G. New insight into a convenient base-promoted synthesis of $\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}$. *Chem. Commun.* **2003**, No. 13, 1578–1579.
- (87) SAINT; Bruker AXS Inc.: Madison, Wisconsin, USA, 2012.
- (88) APEX2; Bruker AXS Inc.: Madison, Wisconsin, USA, 2012.
- (89) de Assis, F. F.; de Souza, J. M.; Assis, B. H. K.; Brocksom, T. J.; de Oliveira, K. T. Synthesis and photophysical studies of a chlorin sterically designed to prevent self-aggregation. *Dyes Pigm.* **2013**, *98* (1), 153–159.
- (90) Siahcheshm, P.; Heiden, P. High quantum yield carbon quantum dots as selective fluorescent turn-off probes for dual detection of $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ions. *J. Photochem. Photobiol., A* **2023**, *435*, No. 114284.
- (91) Li, Y.; Liu, Y.; Shang, X.; Chao, D.; Zhou, L.; Zhang, H. Highly sensitive and selective detection of Fe^{3+} by utilizing carbon quantum dots as fluorescent probes. *Chem. Phys. Lett.* **2018**, *705*, 1–6.
- (92) Seotsanyana-Mokhosi, I.; Kuznetsova, N.; Nyokong, T. Photochemical studies of tetra-2,3-pyridinoporphyrazines. *J. Photochem. Photobiol., A* **2001**, *140* (3), 215–222.
- (93) Swavey, S.; Quentel, A.; Grzesiak, M.; Hawkins, C.; Vidi, P.-A. Efficient light-induced reactive oxygen species production from a far-red ER-targeting BODIPY dye. *RSC Adv.* **2024**, *14* (52), 38796–38805.
- (94) Benson, S.; de Moliner, F.; Fernandez, A.; Kuru, E.; Asiimwe, N. L.; Lee, J.-S.; Hamilton, L.; Sieger, D.; Bravo, I. R.; Elliot, A. M.; Feng, Y.; Vendrell, M. Photoactivatable metabolic warheads enable precise and safe ablation of target cells in vivo. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1), No. 2369.
- (95) Nardi, G.; Manet, I.; Monti, S.; Miranda, M. A.; Lhiaubet-Vallet, V. Scope and limitations of the TEMPO/EPR method for singlet oxygen detection: the misleading role of electron transfer. *Free Radical Biol. Med.* **2014**, *77*, 64–70.
- (96) Andrés, A.; Rosés, M.; Ràfols, C.; Bosch, E.; Espinosa, S.; Segarra, V.; Huerta, J. M. Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients (logD) from low drug amounts. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *76*, 181–191.
- (97) Ballester, F. J.; Ortega, E.; Bautista, D.; Santana, M. D.; Ruiz, J. Ru(II) photosensitizers competent for hypoxic cancers via green light activation. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (71), 10301–10304.
- (98) Sun, J.; Wang, Y.; Du, Y.; Zhang, W.; Liu, Z.; Bai, J.; Cui, G.; Du, Z. Involvement of the JNK/HO-1/FTH1 signaling pathway in nanoplastic-induced inflammation and ferroptosis of BV2 microglia cells. *Int. J. Mol. Med.* **2023**, *52* (1), No. 61.
- (99) Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9* (7), 671–675.