



UAI
UNIVERSIDAD ADOLFO IBÁÑEZ

UNIVERSIDAD ADOLFO IBÁÑEZ
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS
MAGÍSTER CIENCIAS DE LA INGENIERÍA
MENCIÓN BIOINGENIERÍA

**SÍNTESIS DE NUEVOS FOTOSENSIBILIZADORES
BASADOS EN COMPLEJOS DE OS(II) CON
EXTENDIDA CONJUGACIÓN $\pi - \pi$ PARA TERAPIA
FOTODINÁMICA CONTRA CÉLULAS CANCEROSAS
MCF-7**

ALUMNA: ANITA CRISTINA MORA GÓMEZ

PROFESOR GUÍA: DANILO HERMO JARA QUINTEROS

CO-TUTOR TESIS: PATRICIA TORO SÁNCHEZ

*Tesis realizada acorde a los requerimientos para el grado de Magister en Ciencias de la Ingeniería
mención bioingeniería y para el título de Ingeniera Civil Industrial*

de la

Facultad de Ingeniería y Ciencias

DICIEMBRE

2025

Agradecimientos

A todas las personas que han acompañado este proceso, deseo expresarles mi más profundo agradecimiento. A mi familia, por su apoyo incondicional, por sostenerme con paciencia y confianza en cada etapa, y por ser siempre un pilar fundamental en mi vida, acompañándome con el lema: “*Que nadie ni nada detenga tus sueños y metas*”. A mi ángel guardián, esta meta la estamos cumpliendo juntos.

A mi profesor guía, le agradezco sinceramente su orientación y acompañamiento en esta etapa. Extiendo un agradecimiento especial al equipo de química del laboratorio de Francisco Galindo en España, quienes me recibieron con gran amabilidad y me integraron plenamente en su grupo, brindándome apoyo profesional y humano durante mi estancia. Su disposición para compartir conocimientos y abrirme espacio en su trabajo fue fundamental para enriquecer esta etapa.

Agradezco también a Hugo, fiel compañero de aventuras, quien con su compañía constante y lealtad hizo más ligeros los días difíciles y más especiales los días buenos. Su presencia fue un apoyo invaluable a lo largo de todo este camino.

Finalmente, agradezco a mis amigos, cuya compañía y palabras de ánimo hicieron este camino más llevadero. A todas las personas que, de una u otra forma, contribuyeron a la realización de esta tesis, les ofrezco mi más sincero agradecimiento.

Anita Cristina Mora Gómez

Chile – 2025

Resumen

La terapia fotodinámica (TFD) es una técnica que combina una molécula llamada fotosensibilizador, luz y oxígeno para inducir de manera selectiva la destrucción de células cancerosas, consolidándose como una alternativa prometedora para el tratamiento del cáncer, debido a su alta selectividad tumoral. En esta tesis se sintetizó y caracterizó una serie de complejos polipiridínicos de Os(II) coordinados a ligandos fenantrolínicos con conjugación π extendida, con el objetivo de evaluar su fototoxicidad contra la línea celular de cáncer de mama MCF-7 en cultivos 2D como modelo *in vitro* de TFD. Los complejos obtenidos fueron caracterizados mediante técnicas espectroscópicas y fotoquímicas, evaluándose su coeficiente de extinción molar, fotoluminiscencia, tiempos de vida del estado excitado, rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete, una especie reactiva de oxígeno que genera daño oxidativo, y fotoestabilidad. Los resultados evidencian una absorción significativa en la región visible/infrarrojo cercano y altos rendimientos de oxígeno singlete, superando a fotosensibilizadores comerciales de referencia. Adicionalmente, se realizaron estudios preliminares de viabilidad celular mediante ensayos MTT en células MCF-7, mostrando un desempeño fotodinámico prometedoro. En conjunto, estos resultados posicionan a los complejos de Os(II) desarrollados como candidatos prometedores para futuras aplicaciones en TFD. Finalmente, el trabajo incorpora una formulación y evaluación económica de los fotosensibilizadores de Os(II) orientada al escalamiento del nivel de madurez de la tecnología, abordada desde una perspectiva B2B y orientado a la valorización temprana de los compuestos desarrollados y a su potencial transferencia hacia actores especializados del sector oncológico para etapas posteriores de desarrollo y escalamiento.

Palabras Clave: Terapia fotodinámica, Complejos polipiridínicos Os(II), Oxígeno singlete, Línea celular MCF-7, Viabilidad económica de la transferencia tecnológica, B2B.

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) is a technique that combines a molecule called a photosensitizer, light, and oxygen to selectively induce the destruction of cancer cells, establishing itself as a promising alternative for cancer treatment due to its high tumor selectivity. In this thesis, a series of Os(II) polypyridyl complexes coordinated to phenanthroline ligands with extended π -conjugation were synthesized and characterized, with the objective of evaluating their phototoxicity against the MCF-7 breast cancer cell line in 2D cultures as an *in vitro* model of PDT. The obtained complexes were characterized through spectroscopic and photochemical techniques, evaluating their molar extinction coefficient, photoluminescence, excited-state lifetimes, singlet oxygen quantum yield— a reactive oxygen species that generates oxidative damage— and photostability. The results show significant absorption in the visible/Near-infrared region and high singlet oxygen yields, surpassing those of reference commercial photosensitizers. Additionally, preliminary cell viability studies were carried out using MTT assays in MCF-7 cells, showing a promising photodynamic performance. Taken together, these results position the developed Os(II) complexes as promising candidates for future PDT applications. Finally, the work incorporates an economic formulation and evaluation of the Os(II) photosensitizers aimed at scaling the technological maturity level, approached from a B2B perspective and oriented toward the early valorization of the developed compounds and their potential transfer to specialized actors in the oncology sector for later stages of development and scaling.

Keywords: Photodynamic therapy, Os(II) polypyridyl complexes, singlet oxygen, MCF-7 cell line, economic viability of technology transfer, B2B.

Contenido

Agradecimientos.....	1
Resumen.....	2
Abstract.....	3
Capítulo 1.....	8
Introducción	8
a. Contexto global y magnitud del problema.....	8
b. Contexto nacional.....	10
c. Fundamentos biológicos del cáncer.....	10
d. Tratamientos convencionales	12
e. Nuevas estrategias.....	13
f. Terapia fotodinámica.....	14
Capítulo 2.....	17
Estado del arte.....	17
a. Fotosensibilizadores.....	17
b. Estudios de viabilidad celular.....	26
c. Encapsulación fotosensibilizadores.....	28
Capítulo 3.....	31
Problemática.....	31
Hipótesis.....	31
Objetivo general	31
Objetivos específicos	31
Capítulo 4.....	32
Metodología y resultados.....	32
Parte I: Síntesis, purificación y caracterización de los complejos de Os(II).....	32
1. Síntesis y caracterización de los ligandos L0, L2, L4.....	32
1.1 Síntesis ligando L0	32
1.2 Síntesis ligando L2	32
1.3 Síntesis ligando L4	33

2. Caracterización de los ligandos L0, L2, L4	33
2.1 ¹ H-RMN del ligando L0.....	33
2.2 ¹ H-RMN del ligando L2.....	34
2.3 ¹ H-RMN del ligando L4.....	35
3. Síntesis del complejo Osbato^[71].....	36
4. Purificación y caracterización del complejo Osbato.....	37
4.1 Espectro de ¹ H-RMN Osbato.....	37
4.2 Cromatografía de Osbato.....	38
4.3 Cristalización de Osbato.....	40
4.4 Factor de retención de Osbato.....	40
4.5 Espectro de ¹ H-RMN Osbato.....	42
5. Síntesis de los complejos de Osmio (II) basados en ligandos fenantrolínicos con extendida conjugación π-π.	42
5.1 Síntesis OsL0.....	43
5.2 Síntesis OsL2.....	43
5.3 Síntesis OsL4.....	43
6. Purificación y caracterización de los complejos de Osmio (II)^[74].....	44
6.1 Purificación y caracterización del complejo OsL0.....	44
6.2 Purificación y caracterización del complejo OsL2.....	46
6.3 Purificación y caracterización del complejo OsL4.....	48
7. Estudio propiedades fotofísicas de los complejos de Osmio (II)^[75].....	49
7.1 Coeficiente de extinción de los complejos de Os(II) en acetonitrilo.	49
7.2 Medición de espectros de fotoluminiscencia en acetonitrilo.....	51
7.3 Medición del rendimiento cuántico de fotoluminiscencia (PL)	52
7.4 Medición del tiempo de vida de fotoluminiscencia.....	53
7.5 Medición de formación de oxígeno singlete	53
7.6 Estudios de fotoestabilidad de los complejos de Osmio (II).	56
7.7 Estudios de fotooxidación de los complejos de Os(II) ^[87]	58
Parte II: Estudios biológicos preliminares.....	62

1. Estudios de viabilidad celular de los complejos de Os(II).....	62
2. Microscopía confocal preliminar ^[100]	76
Parte III: Formulación y evaluación económica de los fotosensibilizadores de Os(II) orientado a escalamiento del nivel de madurez de la tecnología	79
1. Análisis externo	80
1.1 Análisis del microentorno – PESTEL	80
1.2 Análisis del macroentorno – 5 fuerzas de Porter	81
2. Análisis interno – Cadena de Valor.....	83
2.1 Actividades primarias.....	83
2.2 Actividades de apoyo	83
3. FODA	85
3.1 Fortalezas.....	85
3.2 Oportunidades.....	85
3.3 Debilidades.....	85
3.4 Amenazas	85
4. Flujo de caja	86
4.1 CAPEX.....	86
4.2 OPEX	87
4.3 Precio de venta	88
4.4 Flujo de caja	89
Capítulo 5.....	92
Discusión síntesis, purificación y caracterización de los complejos de Os(II)	92
Capítulo 6.....	94
Discusión estudios biológicos preliminares.....	94
Capítulo 7.....	96
Conclusión	96
Capítulo 8.....	98
Trabajos futuros.....	98
Bibliografía	99

Anexo – Gráficos de coeficiente de extinción.....	113
Anexo – Gráficos de fotoluminiscencia	115
Anexo – Tiempo de vida de fotoluminiscencia	116
Anexo – Gráficos de fotólisis	117
Anexo – Gráficos de fotoxidación	121
Anexo – Valores parte económica.....	133
Anexo – Flujo de caja	135

Capítulo 1

Introducción

a. Contexto global y magnitud del problema

Desde el año 2000, el cáncer se ha consolidado como una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Se estima que para el año 2040 habrá un incremento del 60% en el número de casos, llegando a 21,7 millones de nuevos diagnósticos de cáncer^[1]. En este contexto, el cáncer de mama se posiciona como una de las patologías oncológicas más relevantes, siendo en 2022 el cuarto tipo de cáncer con mayor número de muertes a nivel mundial, con 666.103 casos, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS)^[2].

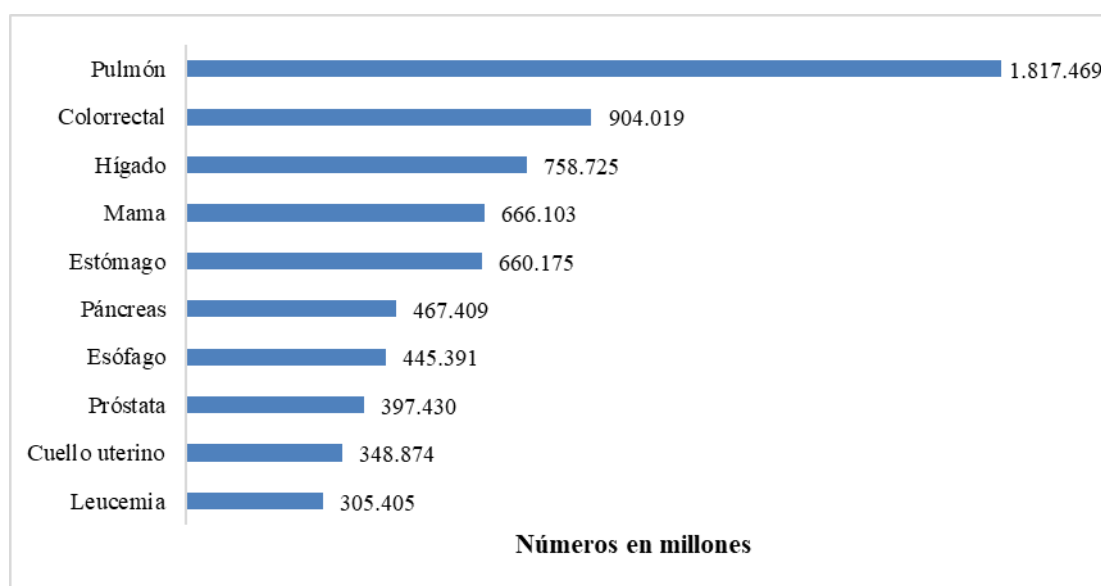


Figura 1. Distribución global del número de muertes por tipo de cáncer, donde el cáncer de mama se posiciona como la cuarta causa de mortalidad a nivel mundial, con 66.103 fallecimientos. Adaptado desde IARC^[2].

De acuerdo con las proyecciones de la OMS y considerando la información del 2022, se estima que para el año 2050 habrá un incremento de nuevos casos de cáncer de mama en mujeres del 54%, alcanzando los 3,55 millones de nuevos diagnósticos de cáncer a nivel mundial^[3].

En términos de mortalidad, las proyecciones globales para el 2050 indican que las muertes por cáncer de mama en mujeres aumentarían cerca de un 71%, en comparación con las cifras registradas en 2022, llegando a 1,14 millones de muertes^[3].

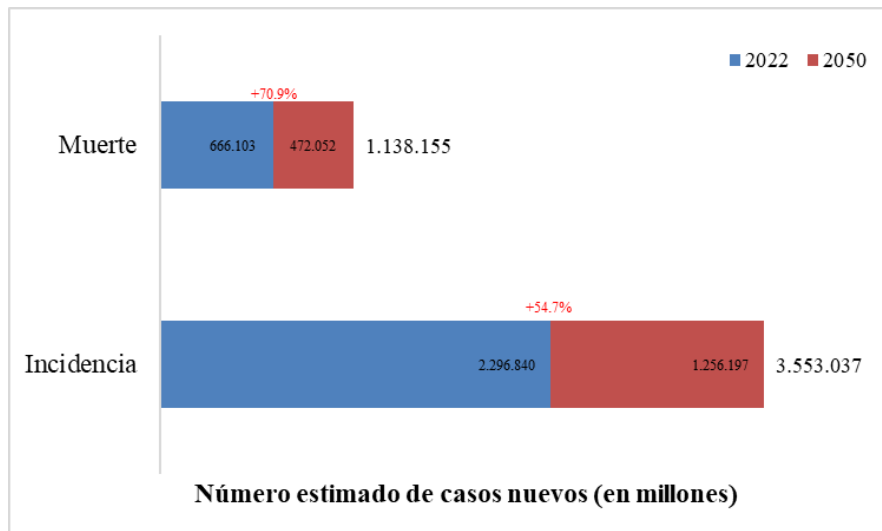


Figura 2. Proyección global de nuevos casos y muertes por cáncer de mama en mujeres para el año 2050, donde se estima un aumento del 54,7% en los nuevos diagnósticos y del 70,9% en la mortalidad en comparación con las cifras registradas en 2022. Adaptado desde IARC^[3].

Respecto a la distribución global de mortalidad por cáncer de mama, se observan tasas elevadas en países de Europa, Norteamérica, Oceanía y América del Sur, mientras que regiones de África presentan tasas menores^[2]. Esta distribución, se puede explicar por el nivel de acceso al diagnóstico y calidad de los registros epidemiológicos, lo que posiciona al cáncer de mama como una problemática predominante a nivel mundial.

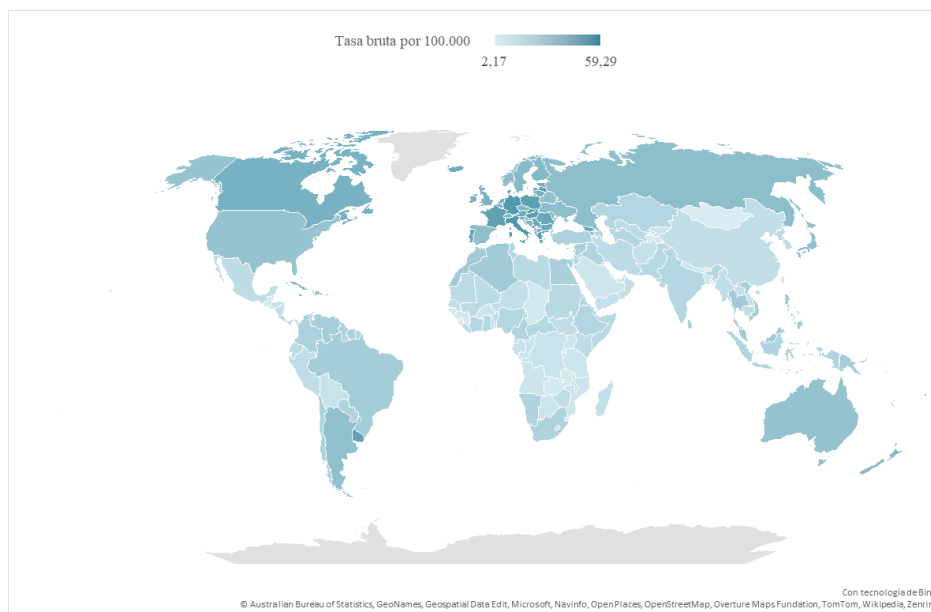


Figura 3. Mapa mundial que muestra la tasa cruda de mortalidad por cáncer de mama en mujeres durante el año 2022, evidenciando la variación geográfica de la carga de mortalidad a nivel global. Adaptado desde IARC^[2].

b. Contexto nacional

En el contexto chileno, este patrón global se replica. Al analizar la mortalidad por tipo de cáncer en mujeres, el cáncer de mama se posiciona como la principal causa de muerte oncológica femenina, registrándose en el año 2022 una tasa cruda de mortalidad de 18,2 muertes por cada 100.000 mujeres en el país^[2].

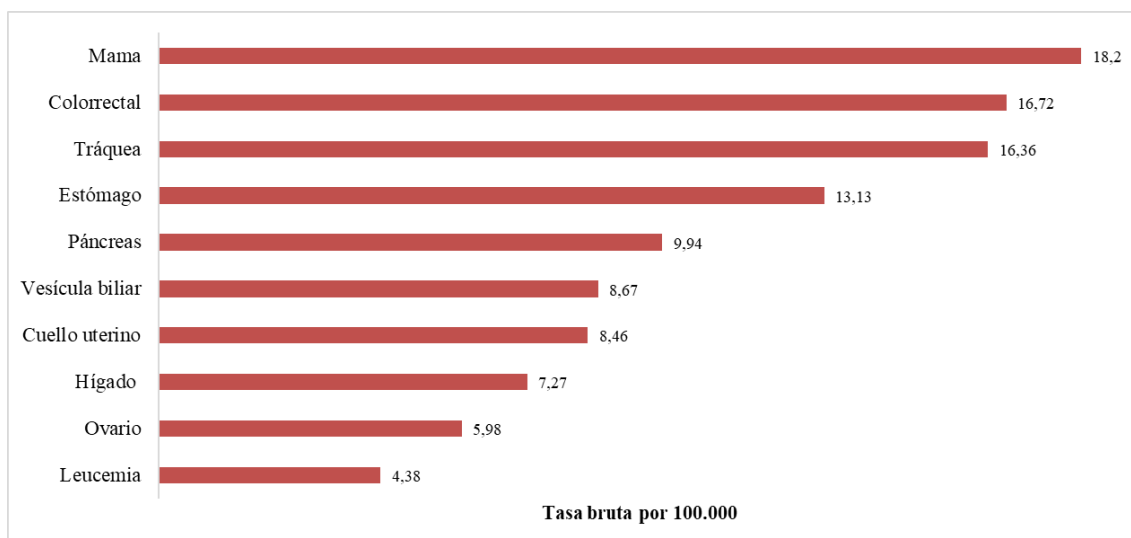


Figura 4. Mortalidad en mujeres por tipo de cáncer en Chile durante el año 2022. El gráfico muestra que el cáncer de mama constituye la principal causa de muerte oncológica femenina en el país, alcanzando una tasa bruta de mortalidad de 18,2 fallecimientos por cada 100.000 mujeres. Adaptado desde IARC^[2].

De esta manera, para el año 2024, el cáncer de mama es el cáncer más frecuente en mujeres en Chile. De acuerdo con datos del Observatorio Global del Cáncer, cada año se registran alrededor de 5.640 nuevos diagnósticos con una incidencia de 38,2 casos por cada 100 mil habitantes. Asimismo, según el Ministerio de Salud, se estima que diariamente seis mujeres fallecen por esta enfermedad^[4]. Estos resultados confirman que el cáncer de mama representa una carga significativa en términos de mortalidad, posicionándose como un problema prioritario de salud en Chile.

c. Fundamentos biológicos del cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se originan a partir de la acumulación de alteraciones genéticas en una célula que pierde los mecanismos de control de proliferación y supervivencia. Estas se deben a factores genéticos o externos que generan procesos celulares conocidos como los *sellos distintivos del cáncer* vinculados con el control del ciclo celular como hiperproliferación celular, evasión de factores supresores de crecimiento, activación de invasión y metástasis, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos) y resistencia a apoptosis (muerte celular programada)^[5].

A estos procesos, se agregan cuatro más emergentes en la formación y mantención del cáncer que generan procesos que modifican el contexto celular, alterando las células cancerosas y provocando una progresión tumoral^[5]. Estos son:

1. Inestabilidad genómica, que altera a las células cancerosas y provoca una progresión tumoral.
2. Inflamación por células inmunes innatas diseñadas para combatir infecciones o sanar heridas, provocando procesos promotores de respuesta inflamatoria tumoral.
3. Modificación del metabolismo celular, que favorece la proliferación neoplásica.
4. Evasión de la respuesta inmunológica, mediante mecanismos que neutralizan la acción de linfocitos T y B, macrófagos y *natural killers*, generando blancos terapéuticos diferentes a los convencionales.

Desde el punto de vista morfológico, las células cancerosas presentan características distintivas como núcleos irregulares, nucléolos múltiples, segmentación nuclear, citoplasma basófilo escaso con aparición de nuevas estructuras, un aparato de Golgi poco desarrollado y una reducción progresiva del volumen mitocondrial a medida que avanza el desarrollo tumoral^[6]. Además, estas células poseen la capacidad de desplazarse y colonizar sectores del organismo generando metástasis. Para favorecer su crecimiento, inducen la activación de células endoteliales y promueven la angiogénesis provocando crecimiento tumoral^[5].

Cabe destacar que el cáncer es un proceso de cinco fases^[7]:

1. Fase de inducción: en esta etapa ocurren los cambios celulares que le dan las características de multiplicación descontrolada y capacidad de invasión^[7].
2. Fase *in situ*: se caracteriza por la existencia de la lesión cancerosa microscópica localizada en el tejido donde se ha originado^[7]. En esta etapa se inicia propiamente el desarrollo del tumor, sin evidencia de invasión a tejidos adyacente. Este proceso incluye una secuencia de cambios celulares progresivos^[8]:
 - a. Hiperplasia: la célula alterada se divide de manera descontrolada y si bien aparentan ser normales, el riesgo surge de su cantidad excesiva^[8].
 - b. Displasia: Se presentan cambios adicionales a las células que llevan a un crecimiento continuo y anormal. Las células y tejidos ya no se ven normales porque se desorganizan^[8].
 - c. Carcinoma *in situ*: Se presentan más cambios y las células cancerosas se propagan para predominar el área y se vuelven más primitivas respecto a su capacidad. Por ejemplo, una célula de hígado alterada ya no produce proteínas específicas para el hígado^[8].
3. Fase de invasión local: la lesión comienza a extenderse fuera del origen e invade tejido y órgano adyacentes^[7]. Consolidándose como un tumor localmente avanzado.
4. Fase metastásica: es la etapa de invasión a distancia. La enfermedad se disemina fuera de su lugar de origen, a través de la circulación sanguínea o linfática, proceso denominado metástasis^[7].

5. Fase de final de vida: en esta etapa la enfermedad oncológica se encuentra avanzada e irreversible, ya que no responde a los tratamientos empleados [7].

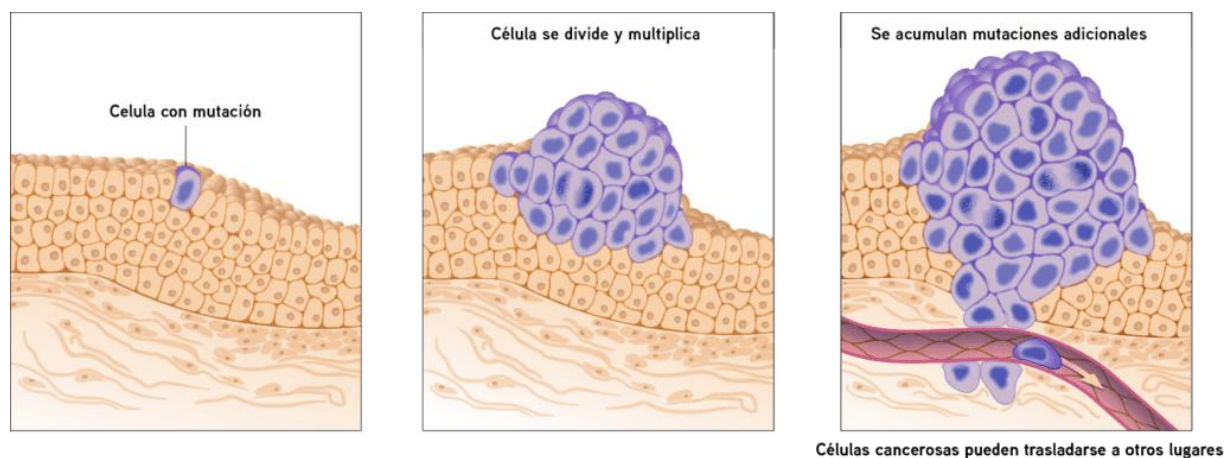


Figura 5. Fases del desarrollo del cáncer, desde la aparición inicial de una célula mutada hasta su capacidad de desplazarse e invadir otros tejidos. El proceso comienza cuando una célula altera sus mecanismos de control, permitiéndole dividirse de manera desregulada. A medida que estas células anómalas continúan proliferando, la masa celular crece progresivamente. Con el tiempo, la acumulación adicional de alteraciones genéticas favorece la invasión de tejidos circundantes y, finalmente, la diseminación hacia otras partes del organismo por vía sanguínea o linfática, dando lugar al proceso de metástasis^[9]

Adicionalmente, a lo largo de estas etapas, los tumores cancerosos desarrollan la capacidad de evadir los mecanismos normales de muerte celular programada (apoptosis), así como de eludir la detección y destrucción por parte del sistema inmunológico, lo que contribuye de manera significativa a su progresión y agresividad^[6].

d. Tratamientos convencionales

Actualmente, la quimioterapia es uno de los principales tratamientos de muchos tipos de cáncer en diferentes etapas, pese a que las células cancerosas pueden desarrollar resistencia a los fármacos quimioterapéuticos y no responden al tratamiento^[10], actúa de forma sistemática a células con alta tasa de división, como las del epitelio intestinal, la médula ósea o los folículos pilosos^[11].

Sin embargo, los agentes quimioterapéuticos convencionales son compuestos citotóxicos inespecíficos y no selectivos, lo que se manifiesta en efectos secundarios para la salud de las personas como toxicidad hematológica afectando negativamente al sistema hematopoyético, cuya función es retirar de la circulación las células viejas o las defectuosas, eliminarlas y reemplazarlas por nuevas.

En el caso del cáncer de mama, los tratamientos convencionales incluyen la cirugía que depende del tamaño, localización y extensión del tumor; la radioterapia, utilizada como terapia complementaria para

erradicar célula tumorales residuales; y la quimioterapia, utilizada con el objetivo de reducir la carga tumoral o controlar la progresión de la enfermedad^[12].

e. Nuevas estrategias

Como la tasa de éxito de los tratamientos convencionales se ve limitada por la toxicidad y la no especificidad para el tipo de tumor, se están desarrollando nuevos métodos para combatir el cáncer, como la inmunoterapia. El mecanismo de las células cancerosas es suprimir la respuesta inmunológica hacia ellas mediante activación de vías reguladoras negativas, impidiendo el correcto funcionamiento del sistema inmunológico, por esta razón, la inmunoterapia estimula este sistema para que reaccione contra los tumores, incluyendo^[5]:

1. Uso de moléculas no específicas, como las citoquinas que median la comunicación entre células.
2. Vacunas, que provocan una respuesta inmune antitumoral generando una acción de células T específica para cada tumor, sin afectar células normales.
3. Virus, se basa en la capacidad oncolítica de los virus por replicación selectiva en el tejido tumoral lo que lleva a una respuesta inflamatoria en el microentorno natural, así, a medida que el sistema inmunológico elimina el virus, los puntos de control inmunitarios suprimen la respuesta inflamatoria.
4. Terapia celular adaptativa, recolección y uso de células inmunitarias, como los linfocitos T, para tratar el cáncer.
5. Anticuerpos monoclonales, inhibidores de puntos de control, que son las vías inhibitorias activadas por células cancerosas.

Otro tratamiento para el cáncer es la terapia fotodinámica (TFD), que surge hace tres mil años atrás en Egipto e India donde utilizaban la luz solar y psoralenos, químicos que se encuentran en algunas plantas, para tratar la psoriasis. Luego, en los años 1900 Von Tappeiner plantea el término de “*Photodynamic action*” en aplicaciones clínicas para tratar tumores cutáneos^[13] y en 1903 se reconoce a Niels Finsen con el premio Nobel por tratar la tuberculosis cutánea con luz ultravioleta^[14]. Formalmente, desde la década de 1970 se comenzó a estudiar la combinación de luz con fotosensibilizadores para tratar diferentes tipos de cáncer, así, en 1972 Diamond demostró la reducción del crecimiento tumoral mediante la acción fotodinámica^[15]. Así, esta técnica se ha utilizado para tratar condiciones de la piel, infecciones microbianas y fungi, degeneración molecular producto de la edad y como complemento para tratamientos convencionales como cirugías, quimioterapia y/o radioterapia, pero también los ha reemplazado según el tipo de cáncer^[16], ya que ha mostrado ser eficaz en cáncer de piel, pulmón, esófago y vejiga, especialmente durante la *fase in situ*, cuando el tumor está confinado al tejido de origen.

Además, el mercado global de la terapia fotodinámica, que corresponde al conjunto de productos, tecnologías y servicios asociados al uso clínico de fotosensibilizadores activados por luz para el tratamiento de enfermedades, principalmente cáncer, afecciones dermatológicas y patologías oftalmológicas, ha mostrado un crecimiento sostenido. En 2023 fue valorado en 1,77 mil millones de dólares y se espera que para el año 2032 llegue a 3,43 mil millones de dólares con una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) del 7,7%. En este ámbito, América del Norte presenta la mayor participación del mercado con un 36,72% de participación en el 2023^[17].

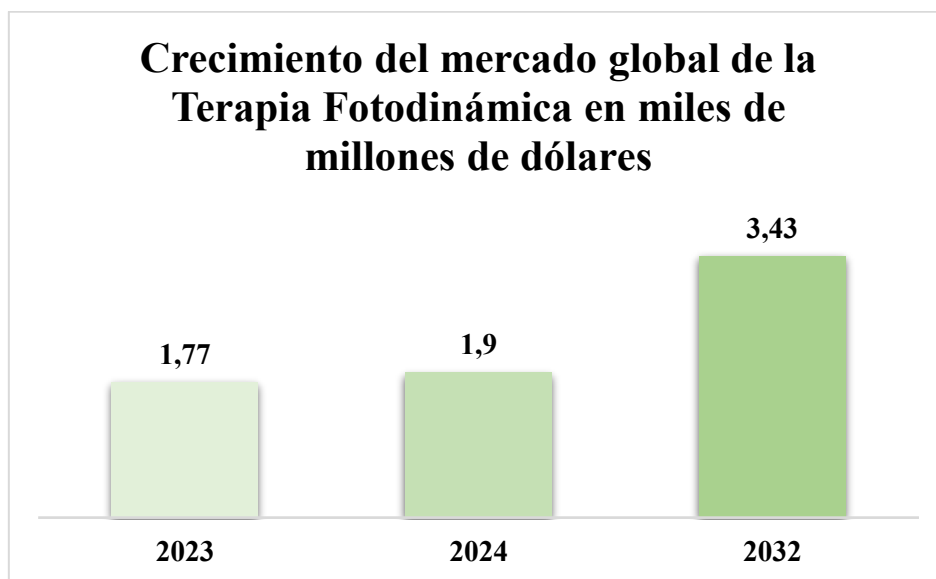


Figura 6. Se presenta la proyección del crecimiento del mercado global de la Terapia Fotodinámica, expresado en miles de millones de dólares. Se observa una tendencia de incremento sostenido a lo largo del periodo analizado, reflejando un fortalecimiento continuo del sector. Para el año 2032, se estima que el mercado alcanzará los 3,43 mil millones de dólares, cifra que prácticamente duplica el valor registrado en 2023 (1,77 mil millones de dólares). Esta proyección evidencia una expansión significativa y un creciente interés internacional en el desarrollo, adopción y aplicación clínica de la TFD^[17].

Respecto a la aplicación de la terapia fotodinámica, el segmento de cáncer concentra la mayor participación de mercado en el 2023. Esto se atribuye a la creciente prevalencia del cáncer, que impulsa la demanda de terapias innovadoras y los beneficios de la terapia fotodinámica, superiores a las técnicas conocidas^[17].

f. Terapia fotodinámica

TFD requiere de tres elementos: una molécula llamada fotosensibilizador (FS), luz visible y oxígeno molecular. Su actividad conjunta genera especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden inducir daño oxidativo dirigido al ADN y otras biomoléculas. Existen dos mecanismos de acción que dependen de la presencia de oxígeno en el medio intracelular (véase Figura 6), en ambos el FS ingresa a la célula y

es irradiado a una luz de onda específica para alcanzar el estado excitado singlete ($^1FS^*$) y por un proceso de cruce entre sistemas (ISC) pasa al estado excitado triplete ($^3FS^*$) que posee mayor tiempo de vida^[18].

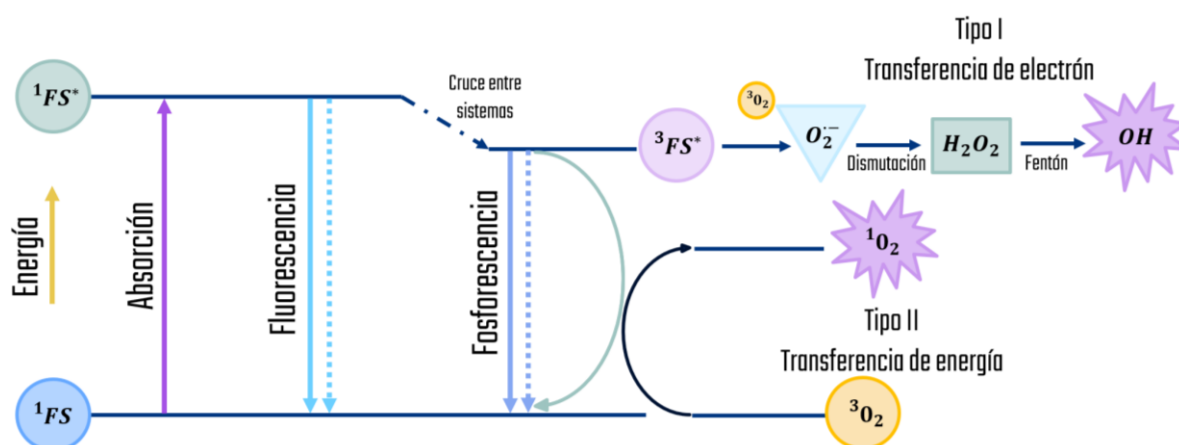


Figura 7. Diagrama de Jablonski simplificado que ilustra la producción fotosensible de radicales libres en el mecanismo Tipo I y oxígeno singlete ($^1O_2$) en el mecanismo Tipo II, desde el estado excitado triplete ($^3FS^*$) de un fotosensibilizador (FS). Tras la absorción de luz dentro de la ventana terapéutica de la TFD, el fotosensibilizador pasa primero a un estado excitado singlete, desde el cual puede sufrir un cruce intersistema hacia el estado excitado triplete, etapa clave para la posterior transferencia electrónica o de energía^[19].

Por un lado, en el mecanismo Tipo I ocurre una transferencia directa de electrones entre el FS excitado ($^3FS^*$) y un sustrato, produciendo radicales libres que pueden reaccionar con el oxígeno para formar un oxígeno activo como el anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$)^[18].

Por otro lado, en el mecanismo Tipo II, el estado excitado triplete ($^3FS^*$) transfiere directamente su energía al oxígeno molecular ($^3O_2$), presente en la célula cancerosa, para producir oxígeno singlete ($^1O_2$), una forma altamente reactiva de oxígeno^[18].

El principal componente de la TFD es el fotosensibilizador, una molécula que se localiza estratégicamente en células o tejidos tumorales. Al ser irradiado con luz de una longitud de onda y una dosis específicas, el fotosensibilizador se activa y desencadena la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas especies inducen daño oxidativo en la célula tumoral, afectando estructuras críticas como el ADN, las proteínas y las membranas celulares.

Dado que las células cancerosas presentan un metabolismo altamente activo y un estado basal de estrés oxidativo elevado^[20], resultan especialmente susceptibles a incrementos abruptos en los niveles de ROS. Esta sobrecarga oxidativa supera los mecanismos antioxidantes celulares y puede conducir a la activación de vías de muerte celular, como apoptosis o necrosis^[21], lo que constituye la base del mecanismo de acción de la TFD.

En este sentido, es primordial un diseño eficaz de fotosensibilizador que debe cumplir con ser una única sustancia pura de composición conocida, estable a temperatura ambiente; no presentar toxicidad en oscuridad hasta ser irradiado por una frecuencia de luz específica dentro de la ventana terapéutica (650-900 nm)^[13]. Además, debe contar con propiedades óptimas de absorción, distribución, metabolismo y excreción, alto rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete, presentar una acumulación en el tejido tumoral favorable y carecer de efectos mutagénicos o cancerígenos^[22].

Cabe destacar que, la profundidad de penetración de la luz en los tejidos biológicos aumenta con la longitud de onda, ya que la dispersión y la absorción determinan su propagación dentro del tumor. Al incrementar la longitud de onda desde 550 hasta 630 nm, rango donde se activa el fotosensibilizador Photofrin II, la penetración lumínica se duplica y continúa aumentando hasta los 700 nm, alcanzando la mayor profundidad en la región infrarroja, donde la energía lumínica logra atravesar capas tisulares más profundas^[23].

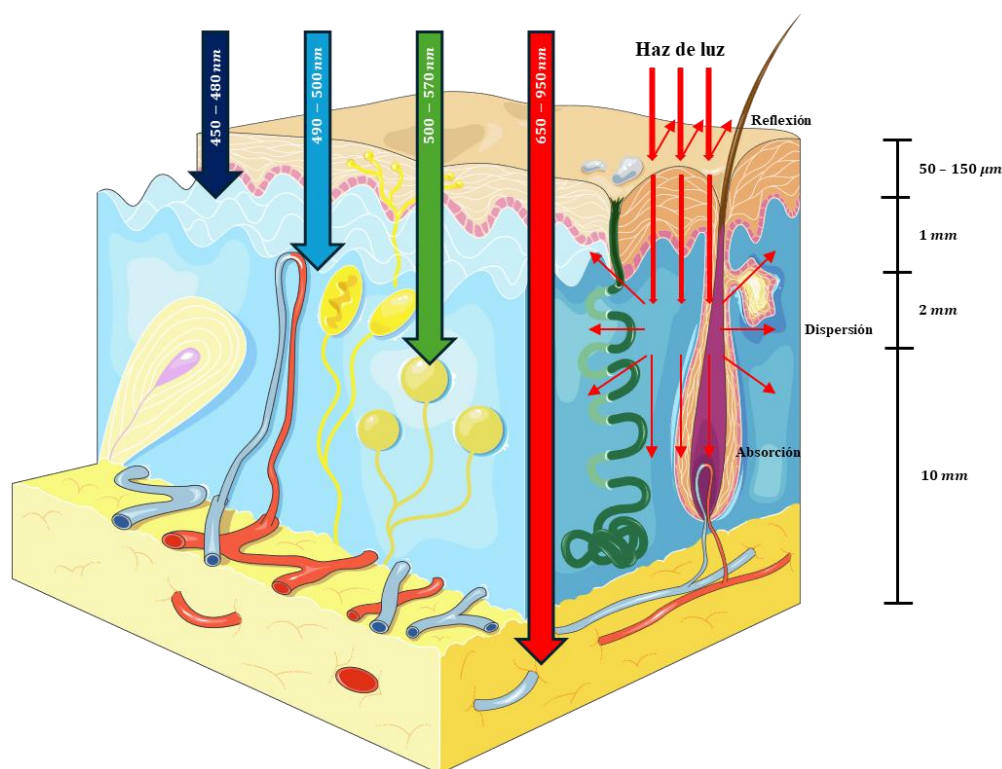


Figura 8. Representación esquemática de la penetración tisular de distintos rangos de longitud de onda. El diagrama muestra cómo la luz incidente atraviesa las capas de la piel, epidermis, dermis y tejido subcutáneo, experimentando procesos de reflexión, dispersión y absorción. Se ilustran cuatro bandas espectrales relevantes: 450–480 nm, 490–510 nm, 530–570 nm y 650–950 nm, cada una con diferente capacidad de penetración tisular. Las flechas más profundas corresponden a longitudes de onda en el rango rojo e infrarrojo cercano, que presentan mayor penetración (hasta 10 milímetros), mientras que las bandas azul y verde muestran una penetración más superficial. Adaptado de “Photodynamic Therapy of Cancer: An Update”^[24].

Capítulo 2

Estado del arte

a. Fotosensibilizadores

Respecto al desarrollo y optimización de fotosensibilizadores, entre 1950 y 1960 se desarrollaron los primeros fotosensibilizadores de primera generación basados en porfirinas^[13], dentro de los cuales destaca Photofrin® (véase Figura 9), el único FS aprobado mundialmente para tratar diferentes tipos de cáncer, como de esófago y pulmón^[16]. Se localiza en el aparato de Golgi y membrana plasmática, absorbe en 630 nm lo que permite una penetración tisular moderada, y actúa mediante daño vascular que induce necrosis. No obstante, presenta baja selectividad tumoral y un retención prolongada que provoca fotosensibilidad.

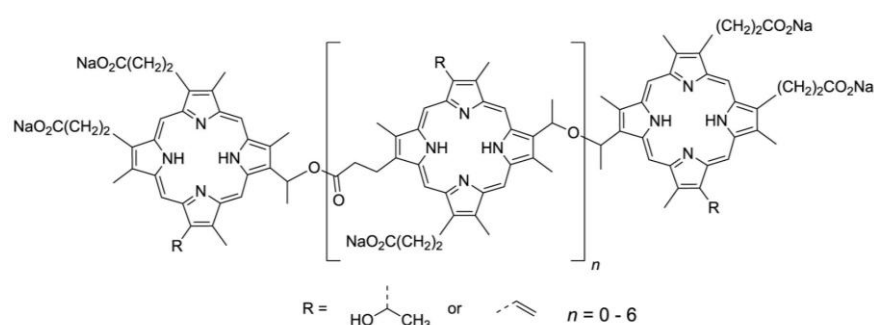


Figura 9. Estructura química del primer fotosensibilizador aprobado, Photofrin® de primera generación.

Como los fotosensibilizadores de primera generación contaban con una baja solubilidad, baja selectividad, baja absorción en el infrarrojo cercano y efectos secundarios prologados^[27], se desarrollan los de segunda generación (véase Tabla 1), que a partir de moléculas más purificadas como clorinas, ftalocianinas, benzoporfirinas, además, contaban con una mejor absorción (entre 650 a 700 nm) y mayor selectividad celular.

Tabla 1. Clasificación comparativa de fotosensibilizadores de segunda generación empleados en Terapia Fotodinámica (TFD), detallando su nombre comercial, tipo químico, longitud de onda de activación, principales aplicaciones clínicas y ventajas asociadas:

Fotosensibilizador	Nombre comercial	Tipo químico	Longitud de onda (nm)	Aplicaciones clínicas	Ventajas
Metil aminolevulinato (MAL) (2ª gen) ^[28]	Metvix®	Precursora de protoporfirina IX	~635	Queratosis actínica, cáncer de piel.	Buena selectividad, usada en dermatología.
Ácido aminolevulínico (ALA) (2ª gen) ^[29]	Levulan®	Precursora de protoporfirina IX	~635	Cáncer de piel, queratosis actínica.	Tópico, selectivo, baja toxicidad sistémica.

Temoporfina (2 ^a gen) ^[30]	Foscan®	Clorina (clorina e6 derivado)	~652	Cáncer de cabeza y cuello.	Alta absorción, mayor penetración en tejidos.
Radachlorin® (2 ^a gen) ^[31]	Radachlorin®	Clorina derivada	~662	Tumores sólidos, uso en Rusia/Corea.	Buen perfil de seguridad, rápida eliminación.
Verteporfina (2 ^a gen) ^[32]	Visudyne®	Benzoporfirina	~689	Degeneración macular relacionada a edad.	Apropiada para enfermedades oculares.

El Photosens (véase Figura 10), fotosensibilizador de segunda generación derivado del Photofrin, presenta una mayor penetración tisular al tener una absorción en 670 nm, se localiza en mitocondrias y lisosomas, induce apoptosis y necrosis mediante mecanismo tipo II, aún genera fotosensibilidad pero tiene una mejor selectividad tumoral ^[33].



Figura 10. Estructura química del Photosens®, fotosensibilizador de segunda generación derivado del Photofrin®.

Por su parte los fotosensibilizadores de tercera generación se basan en compuestos metálicos como rutenio Ru(II), iridio Ir(II) y osmio Os(II) que presentan eficiencia en el infrarrojo cercano, mayor penetración óptica y reducción de toxicidad^[34]. A continuación, se presentan las estructuras químicas de algunos fotosensibilizadores desarrollados y estudiados:

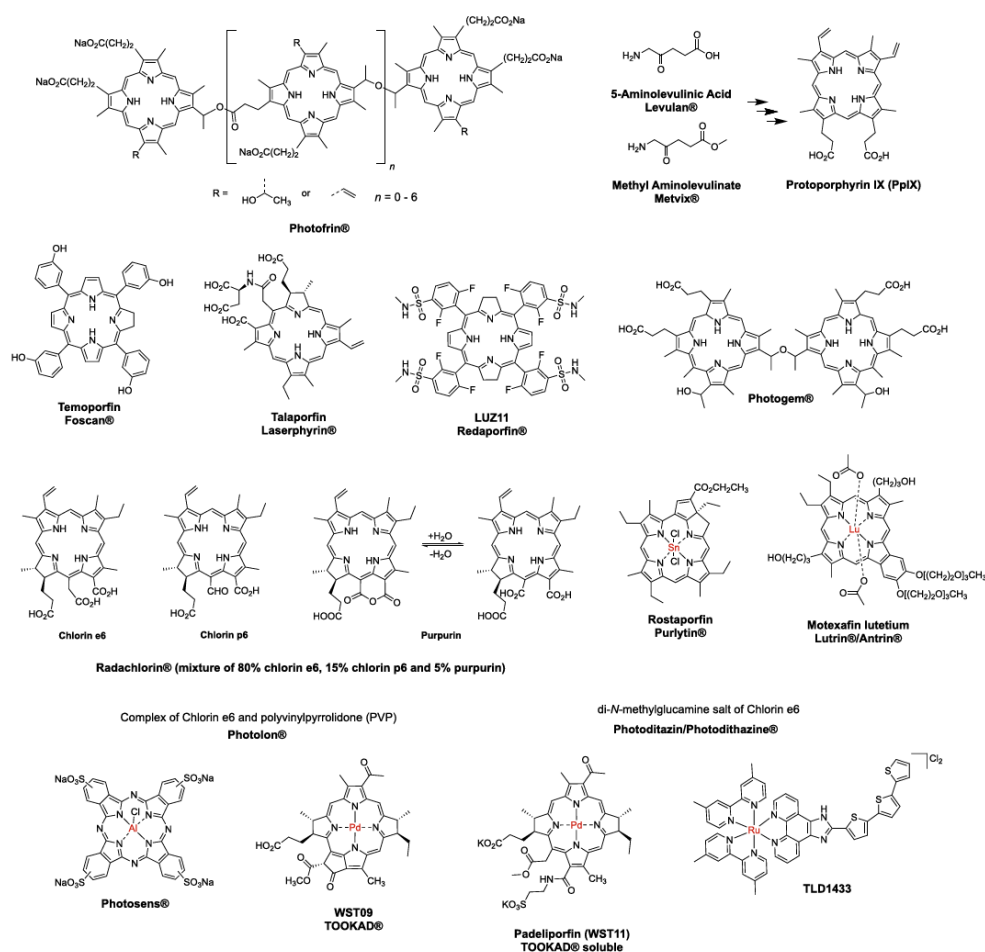


Figura 11. Estructura de fotosensibilizadores aprobados, o en estudios clínicos, para TFD^[16].

Cabe destacar que, algunos fotosensibilizadores de segunda y tercera generación han sido aprobados en países específicos. Por ejemplo:

1. Temoporfin, medicamento para tratar cánceres avanzados que se comercializa bajo el nombre de Foscan®, es de segunda generación y más efectivo que Photofrin®^[35], aprobado solamente en la Unión Europea^[16].
2. Talaporfin, se vende como Laserphyrin®, es a base de clorina y fue aprobado en Japón para tratar cáncer de pulmón y se encuentra en ensayos clínicos para su uso en neoplasias colorrectales y cáncer de hígado^[36].

Estas nuevas generaciones están diseñadas para mejorar la selectividad y la eficiencia, reducir la toxicidad, y permitir su activación mediante longitudes de onda más profundas, lo que facilita el tratamiento de tumores localizados en tejidos internos^[16]. Si bien aún se siguen utilizando compuestos de cisplatino o carboplatino, a partir de sus éxitos y defectos se ha impulsado y potenciado la investigación proliferativa sobre metales de transición que tienen un potencial en terapia fotodinámica^[37] (véase Tabla 2).

Tabla 2. Fotosensibilizadores metálicos en desarrollo para su aplicación en Terapia Fotodinámica (TFD), según su metal central, tipo de ligandos, longitud de onda de activación, ventajas clave y estado actual de investigación o uso clínico:

Complejo metálico	Metal central	Tipo de ligandos	Longitud de onda (nm)	Ventajas clave	Estado actual
TLD-1433 ^[38]	Rutenio Ru(II)	Polipiridínicos	520 (verde)	Alta fotoactividad, buen rendimiento cuántico	Ensayos clínicos Fase II (vejiga)
[Ru(bpy) ₃] ²⁺ y derivados ^{[39][40]}	Rutenio Ru(II)	Bipiridinas	~450–480	Estables, bien estudiados, modificables	Preclínico / investigación
Ir(III)-complexes ^[41]	Iridio Ir(III)	Ciclopentadienilo, fenilpiridinas, N [^] C lig.	500–620	Buena generación de ROS, fotoestabilidad	Preclínico
Pt(II)-porfirinas ^[42]	Platino Pt(II)	Porfirinas y ftalocianinas	~630–690	Dual función (TFD + quimioterapia), núcleo estable	Preclínico
Re(I)-carbonilos ^[43]	Renio Re(I)	Bipiridinas, carbonilos	~400–600	Propiedades luminiscentes, generación de ROS	Investigaciones recientes
Au(III) y Au(I) compuestos ^[44]	Oro Au(I/III)	Fosfinas, N-heterociclos	~500–600	Potencial anticancerígeno, versatilidad estructural	Investigación emergente
Zn(II)-ftalocianinas ^[45]	Zinc Zn(II)	Ftalocianinas (aromáticos macrocíclicos)	~670	Alta absorción en NIR, buena generación de oxígeno singlete	Aprobadas / en uso clínico

Respecto a complejos metálicos, existen dos fotosensibilizadores aprobados mundialmente: TOOKAD SOLUBLE, aprobado mundialmente, y TLD-1433, que se encuentra en estudios clínicos. El primero, es un fotosensibilizador diseñado a base de paladio que absorbe en 753 nm^[46], es específico para tratar cáncer de próstata de bajo riesgo y su principal característica es ser soluble en agua^[16].

En relación con el fotosensibilizador TLD-1433, que es un compuesto a base de rutenio (véase Figura 12), este se encuentra en fase II de un caso clínico para tratar el cáncer de vejiga no invasivo muscular y se puede activar con luz verde a 520 nm^[16], donde tiene un rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete del 56%.

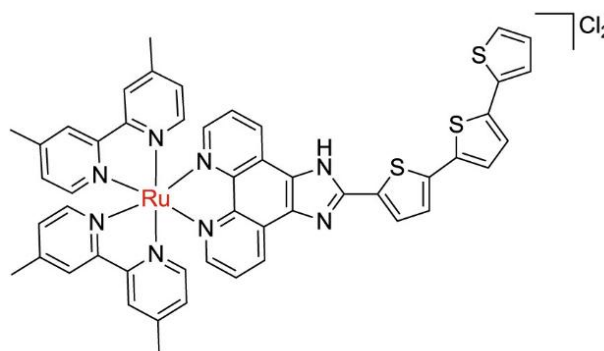


Figura 12. Estructura química del TLD-1433, fotosensibilizador de tercera generación a base de rutenio. Aprobado para Fase II en un caso clínico para tratar el cáncer de vejiga .

Si bien los complejos derivados de rutenio, Ru(II), son los más investigados, la poca concentración y mínima penetración de luz limita su aplicación *in vivo*^[37], en consecuencia, se han estudiado otros fotosensibilizadores metálicos, como los basados en osmio (II), que presentan una mejor absorbancia en el infrarrojo cercano (véase figura 13)^[47] lo que podría significar una aplicación práctica dirigida a tumores sólidos en tejidos más profundos^[37].

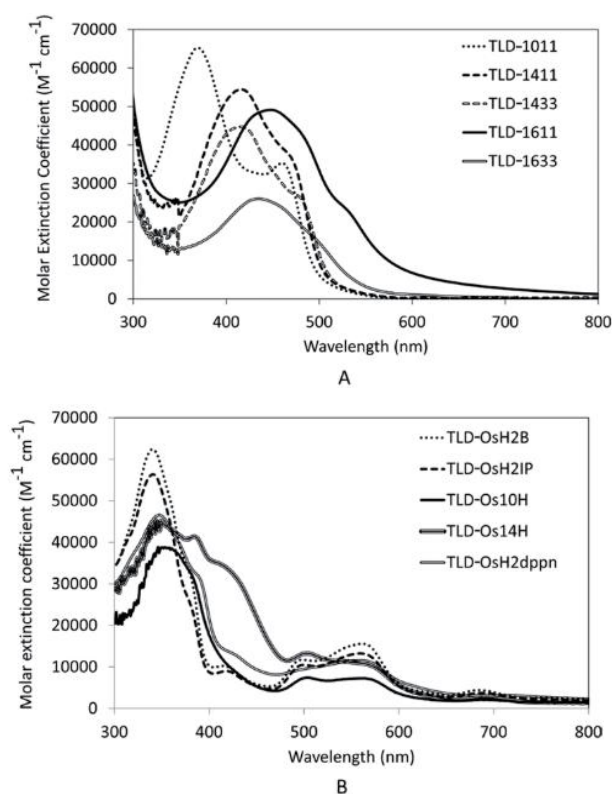


Figura 13. A. Espectro de absorción de derivados de Ru(II), donde se incluye TLD-1433 que se encuentra en estudios clínicos y B. Espectros de absorción de derivados de Os(II) en agua^[47]. Donde los complejos de osmio presentan mayor absorción en el infrarrojo cercano que el actual fotosensibilizador TLD-1433.

Es importante mencionar que el desarrollo clínico de un fotosensibilizador se divide en cinco diferentes etapas progresivas (*Véase Figura 14*). En primer lugar, se encuentra la fase preclínica, cuyo propósito es demostrar que el compuesto posee el perfil necesario para ser probado en humanos. Esta etapa comprende estudios *in vitro* e *in vivo* principalmente en ratones, donde se evalúan parámetros como la toxicidad, selectividad tumoral, mecanismo de acción, estabilidad metabólica y eficacia terapéutica preliminar.



Figura 14. Representación esquemática de las etapas del desarrollo de un fotosensibilizador. La fase preclínica comprende estudios *in vitro* e *in vivo* destinados a evaluar la actividad biológica, la toxicidad inicial y el perfil farmacológico del compuesto. Posteriormente, la fase I se centra en determinar la seguridad, tolerabilidad y dosis máxima segura en un grupo reducido de voluntarios o pacientes. La fase II evalúa la eficacia preliminar y continúa el análisis de seguridad en una cohorte mayor, proporcionando información crítica sobre la respuesta terapéutica. La fase III consiste en estudios multicéntricos de gran escala diseñados para confirmar la eficacia, comparar el nuevo tratamiento con el estándar clínico y establecer un perfil de seguridad robusto. Finalmente, la fase IV corresponde a la etapa de farmacovigilancia posterior a la comercialización, donde se monitorea el uso del fármaco en la población general para detectar eventos adversos poco frecuentes y evaluar su desempeño en condiciones reales^[48].

Luego, en la Fase I, se comprueba que el fotosensibilizador es seguro en humanos. Los ensayos se realizan en un grupo reducido de voluntarios con cáncer y se define la dosis máxima tolerada y el rango seguro de fluencia lumínica^[48].

En la Fase II, se evalúa la eficacia terapéutica y se confirma la seguridad del tratamiento. Durante esta etapa se optimizan parámetros como longitud de onda, intensidad y duración de irradiación, respuesta tumoral y recurrencia local^[48]. Un ejemplo de fotosensibilizador en Fase II es el TLD-1433, basado en rutenio, para tratamiento de carcinoma urotelial no invasivo de vejiga, combinando instilación intravesical y un láser verde de 520 nm.

En la Fase III, se compara el nuevo tratamiento con la terapia estándar y se determina la evidencia suficiente para la autorización comercial^[48].

Finalmente, la Fase IV corresponde al período de post-comercialización, en el cual se monitorea la seguridad, eficacia y desempeño del fármaco en condiciones reales, detectando posibles efectos adversos y optimizando futuras aplicaciones clínicas^[48].

Respecto a los complejos de Os(II) sintetizados como posibles fotosensibilizadores, se encuentran diversos estudios, como el del año 2023 donde Mani A. y sus colaboradores llevaron a cabo una investigación en la que destacan complejos de Os(II) con ligandos fenantrolinicos (véase Figura 15) como fotosensibilizadores prometedores para la terapia fotodinámica. Estos compuestos presentan una fuerte absorción en el rango visible y en el infrarrojo cercano, lo que facilita una mayor penetración de la luz en los tejidos. Además, poseen estados excitados de larga duración, lo que optimiza la transferencia de energía al oxígeno molecular para la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Su alta estabilidad química también los hace menos propensos a degradarse en medios biológicos^[18].

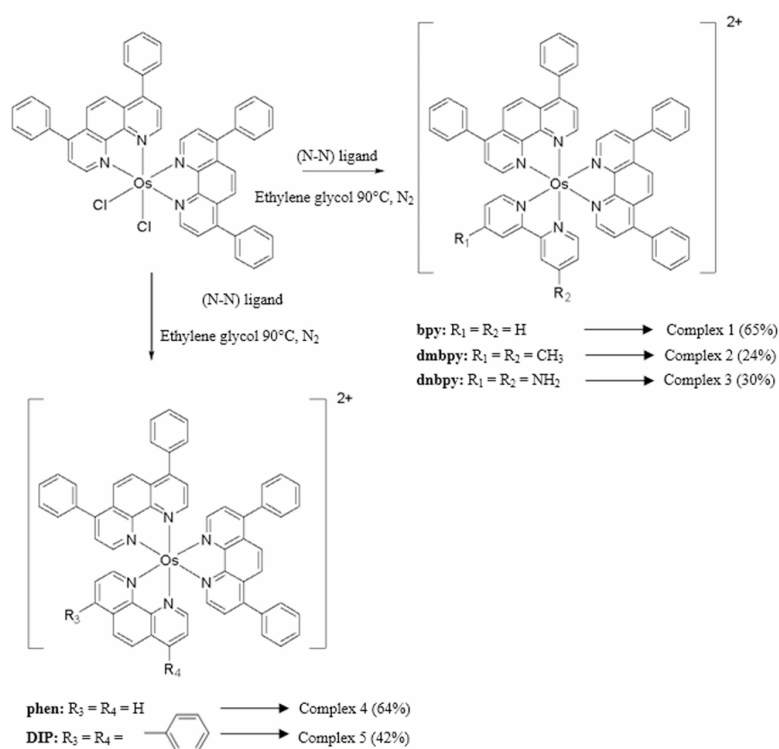


Figura 15. Esquema de síntesis de los complejos de Os(II) coordinados con ligandos polipiridínicos, los cuales presentan alta eficiencia como fotosensibilizador^[18].

Para evaluar su eficacia, se realizaron diversas pruebas *in vitro* e *in vivo*, en las que se observó que las células cancerosas mueren selectivamente bajo irradiación lumínica. En ausencia de luz, los compuestos presentan baja toxicidad, y se propone que su mecanismo de acción involucra la inducción de apoptosis^[18].

Además, la principal prueba biológica en ratones portadores de tumores CT26 de colon demostró que la aplicación de estos compuestos en concentraciones sobre $30\ \mu\text{M}$, en terapia fotodinámica, reduce significativamente el tamaño del tumor (véase Figura 16)^[18]. De esta forma, este estudio demuestra que los complejos de Os(II) polipiridínicos son fotosensibilizadores prometedores para la TFD^[18].

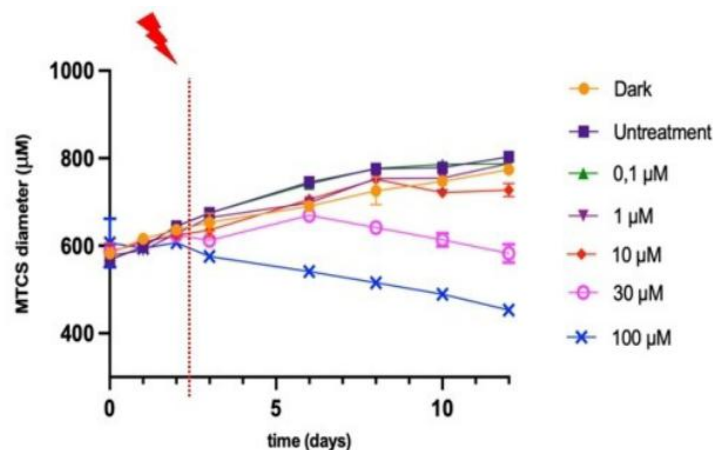


Figura 16. Condiciones de tratamiento y concentraciones del fotosensibilizador. El gráfico compara el crecimiento de los esferoideos en oscuridad, sin tratamiento y bajo exposición a concentraciones crecientes ($0,1$; 1 ; 10 ; 30 y $100\ \mu\text{M}$). Tras la exposición a la luz, se observa que las concentraciones bajas ($0,1$ – $1\ \mu\text{M}$) mantienen un crecimiento similar al control, mientras que concentraciones intermedias (10 – $30\ \mu\text{M}$) reducen la expansión del diámetro. La concentración más alta ($100\ \mu\text{M}$) muestra una disminución progresiva del tamaño de los esferoideos, evidenciando un efecto fototóxico significativo dependiente de la dosis^[18].

Otra investigación en el año 2024 de Zhang presenta complejos fenantrolínicos de Os(II) diseñado para absorber en el infrarrojo cercano, optimizando penetración tisular y eficiencia fotodinámica en condiciones fisiológicas.

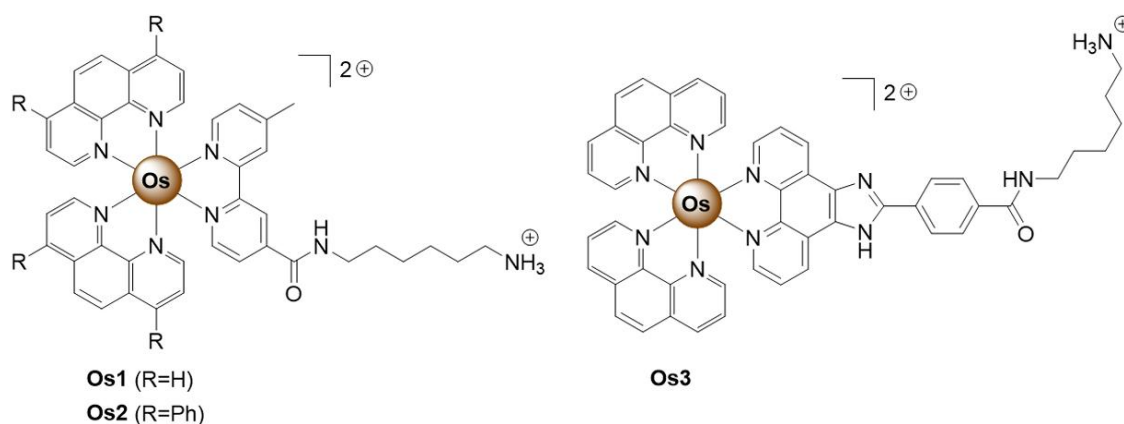


Figura 17. Estructura química del fotosensibilizador desarrollado para que absorba en el infrarrojo cercano y tenga una mayor eficiencia fotodinámica^[49].

El fotosensibilizador exhibe una absorción extendida hacia 700-800 nm, alta estabilidad fotoquímica y una marcada capacidad para generar oxígeno singlete mediante un mecanismo tipo II. El compuesto destaca por inducir muerte celular inmunogénica, un atributo estratégico en oncología moderna porque combina acción citotóxica directa con activación del sistema inmune, ampliando el alcance terapéutico hacia tumores sólidos profundos^[49].

Finalmente, una de las investigaciones más recientes del 2025 es la de Chen F. y colaboradores, donde se buscó diseñar y sintetizar una serie de fotosensibilizadores fenantrolinicos basados en Os(II) con la capacidad de generar oxígeno singlete de manera eficiente, explorando la relación estructura-actividad respecto a la influencia de la aromaticidad^[37].

En total, se sintetizaron cinco complejos de Os(II) (véase *Figura 18*), destacando el complejo Os-3 por sus resultados sobresalientes. Este complejo mostró una acumulación significativa en el citoplasma de células cancerosas, alcanzando 96,1 ng por millón de células en A549 (cáncer de pulmón) y 68,2 ng en HGC-27 (cáncer gástrico). Además, presenta absorción en el infrarrojo (640 nm) y luz azul (465 nm), produciendo oxígeno singlete con una eficiencia del 65% bajo luz azul, superando al complejo de rutenio Ru(bpy)₃Cl₂, cuya eficiencia es de 57% aproximadamente^[37].

En células HGC-27, la concentración requerida para reducir la viabilidad celular al 50% disminuyó hasta 0,32 μM bajo luz azul. No obstante, a pesar de sus múltiples ventajas, estos complejos también presentan toxicidad celular en ausencia de luz^[37].

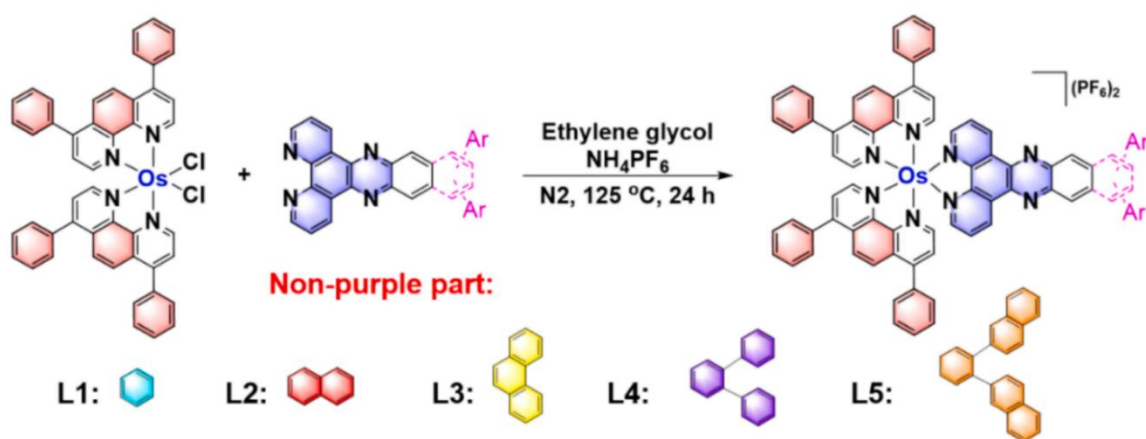


Figura 18. Representación esquemática de la síntesis de complejos de Os(II) mediante la coordinación de diferentes ligandos aromáticos (L1–L5) al núcleo octaédrico del metal, cuyas variaciones estructurales permiten modular las propiedades electrónicas, ópticas y fotoactivas de los complejos resultantes^[37].

Así, se han realizado diferentes investigaciones (véase *Tabla 3*) que prueban que los complejos de Os(II) representan una buena opción como fotosensibilizadores en terapia fotodinámica, ya que presentan una absorción en el rango NIR, lo que permite una profundidad tisular mayor, una alta

generación de oxígeno singlete, una elevada selectividad al blanco biológico y una baja citotoxicidad en oscuridad.

Tabla 3. Comparación de distintos fotosensibilizadores basados en complejos metálicos reportados en la literatura, destacando sus ligandos clave, la región espectral en la que son fotoactivados, el tipo de mecanismo fotodinámico predominante y sus respectivos rendimientos cuánticos de oxígeno singlete ($^1O_2$). Los trabajos recopilados abarcan desde 2010 hasta 2025 y muestran la evolución en el diseño estructural de ligandos orientados a optimizar la absorción en el infrarrojo cercano (NIR) y mejorar la eficiencia fotodinámica:

Paper	Ligandos clave	Longitud de onda y Mecanismo de acción
Zhou et al., 2025 – “Aggregation-induced photosensitization...” ^[50]	- 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina. - 4,4'-terc-butil-2,2'-bipiridina. - 4,4'-dinonil-2,2'-bipiridina.	650 - 850 nm Tipo I y II
Chen et al., 2025 – “Photodynamic-photothermal switching...” ^[51]	- El complejo precursor es cis-[Os(phen) ₂ Cl ₂]. - El ligando que se coordina es una cianina derivada.	600 - 900 nm Tipo II
Gul et al., 2025 – “Near-infrared light-activated...” ^[52]	Os(II)-bis(2,2'-bipiridina)	800-810 nm Tipo I
Roque et al 2020 – “Breaking the barrier...” ^[53]	[Os(phen) ₂ (IP-4T)]Cl ₂ , donde - IP-4T = imidazo-fenantridina con cuatro tiofenos en cadena	733 nm Tipo II
Ge, et al 2018 – “Near-infrared Luminescent...” ^[54]	[Os(bpy) ₂ (L-imino-piridina)] ²⁺ , donde - bpy = 2,2'-bipiridina	738 nm Estudiados como sondas lumínicas
Sun et al, 2010 – “DNA Photocleavage...” ^[55]	[Os(bpy) ₂ (dppn)] ²⁺ , donde - bpy = 2,2'-bipiridina - dppn = benzo[i]dipirido[3,2-a:2,3-c]fenazina	645 nm Tipo II

b. Estudios de viabilidad celular

Si bien las propiedades fotofísicas y la eficiencia en la generación de oxígeno singlete constituyen criterios fundamentales para evaluar el potencial de un fotosensibilizador, estos parámetros deben ser complementados con una validación biológica que confirme su efecto antitumoral. En este contexto, los estudios de viabilidad celular reportados en la literatura se han centrado principalmente en evaluar la fototoxicidad inducida por luz y la citotoxicidad en oscuridad, con el objetivo de determinar la selectividad fotodinámica de los complejos de osmio. Para ello, se han empleado distintas líneas celulares cancerosas, condiciones de solubilización, tiempos de incubación e intensidades de irradiación, utilizando ensayos colorimétricos estándar como CCK-8, MTT y Resazurina (véase Tabla 4).

Tabla 4. Condiciones empleadas en los ensayos de viabilidad celular reportados en la literatura para diferentes complejos de osmio. La tabla resume, para cada línea celular evaluada, el solvente utilizado para solubilizar los compuestos, el tiempo de incubación previo a la irradiación, los parámetros de

irradiación (longitud de onda, intensidad y dosis), el tiempo de incubación post-irradiación y el reactivo empleado para la cuantificación de la viabilidad. Esta recopilación permite comparar los protocolos experimentales comúnmente utilizados con diversas líneas celulares y reactivos colorimétricos (CCK-8, MTT, Presto Blue y Resazurina):

Línea Celular	Solubilidad	Tiempo incubación	Irradiación	Tiempo incubación post-irradiación	Reactivo
MCF-7 ^[50]	1 mM en DMSO, diluido en PBS/DMEM	1 hora	400-700 nm (30mW/cm ²) por 30 minutos	24 horas con un nuevo medio de cultivo.	CCK-8. Incubación de 2 horas
HeLa ^[56]	DMSO, diluido en PBS/medio	8 horas	1 hora. 465 nm. 13mW/cm ²	40 horas	MTT
HT1376 ^[57]	Propilenglicol diluidos en DMEM	4 horas	200 seg a 625 nm (90 J/cm ²) 667 seg a 808 nm (600 J/cm ²)	20 horas	Presto Blue
CT26 ^[49]	DMSO	4 horas, se renueva el medio antes de irradiar	1 hora. 740 nm	40 horas	Resazurina
SK-MEL-28 ^[58]	10% DMSO/H2O. Se diluyen en DPBS	16-21 horas	Rojo 623 nm Verde 523 nm Cool White Visible 400-700 nm	48 horas	Resazurina
MCF-7 / HeLa / HL-60 / MCF-12A ^[59]	Disueltos en 20% DMSO para preparar una solución madre de 1 mM. Luego se diluyeron a 100 µM en PBS y se filtraron (0.22 µm) antes de añadir a los cultivos celulares	24, 48, 72 y 96 horas. La mayoría de las veces son 24 horas de incubación.	Citotoxicidad en oscuridad	24-96 horas	MTT

Cabe destacar que, en este trabajo se realizó un ensayo de viabilidad celular en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 debido a que constituye uno de los modelos *in vitro* estándar más robustos, validados y estratégicamente relevantes para el estudio del cáncer de mama. Su uso sostenido por más de cuatro décadas ha permitido una caracterización exhaustiva de su perfil molecular, proliferativo y funcional, generando un alto grado de reproducibilidad y comparabilidad entre estudios, con evidencia sólida sobre su respuesta a fármacos, mecanismos de resistencia y regulación del crecimiento tumoral^[25].

Además, MCF-7 presenta un fenotipo poco invasivo y de bajo potencial metastásico, lo que la hace especialmente adecuada para evaluar efectos citotóxicos, selectividad terapéutica y mecanismos de muerte celular sin el sesgo de una agresividad basal elevada. Adicionalmente, conserva marcadores epiteliales bien definidos y es compatible con ensayos avanzados *in vitro* como microscopía confocal y modelos tridimensionales, ampliando su utilidad experimental^[25].

No obstante, es importante destacar que se trata de una línea celular correspondiente a un modelo simplificado y más básico que un tumor sólido ya desarrollado, sin la complejidad total del microambiente tumoral *in vivo*, pero que resulta plenamente justificado en etapas tempranas de investigación, ya que permite realizar ensayos preliminares controlados y reproducibles para validar hipótesis, seleccionar condiciones experimentales y determinar el potencial terapéutico antes de avanzar hacia modelos más complejos y cercanos a la realidad clínica^[26].

c. Encapsulación de fotosensibilizadores

Uno de los principales desafíos asociados al uso de complejos de Os(II) y de diversos fotosensibilizadores en estudios de viabilidad celular es su limitada solubilidad en medios acuosos, lo que dificulta su adecuada dispersión en condiciones biológicas y compromete la reproducibilidad de ensayos colorimétricos convencionales, como MTT. Frente a esta limitación, diversas estrategias de formulación han sido exploradas, entre las cuales la encapsulación en sistemas micelares ha emergido como una alternativa eficaz para mejorar la solubilidad, estabilidad y biodisponibilidad de estos compuestos.

En este contexto, un estudio publicado en 2022 describe un fotosensibilizador basado en osmio que presenta una absorción amplia desplazada al rojo, pero cuyo rendimiento cuántico de luminiscencia en PBS es extremadamente bajo, lo que limita su aplicación en imagen óptica *in vivo*. Para superar esta limitación, el trabajo demuestra que su encapsulación en micelas DSPE-mPEG₂₀₀₀ incrementa notablemente su desempeño, logrando una señal lumínica acumulada 47 veces mayor en tumores y hasta 11,7 veces más selectividad tumoral en comparación con el fotosensibilizador libre. Además, la micelación aumenta entre dos y tres veces la generación de especies reactivas de oxígeno, evidenciando que esta estrategia mejora la eficacia fotodinámica del compuesto^[60].

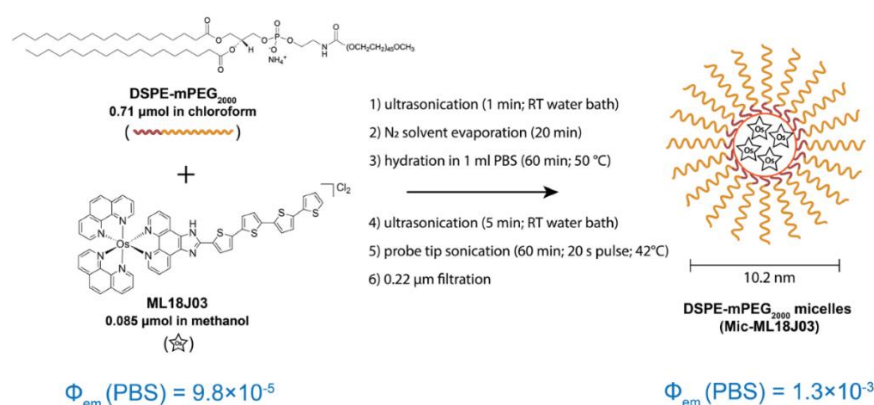


Figura 19. Esquema de la formulación del complejo ML18J03 en micelas DSPE-mPEG2000, mostrando las etapas de ultrasonificación, evaporación del solvente, hidratación en PBS y filtración empleadas para obtener las nanoestructuras micelares. La incorporación del complejo en el núcleo hidrofóbico de las micelas aumenta significativamente su rendimiento cuántico de emisión en medio

acuoso, permitiendo mejorar la señal luminiscente y facilitando la generación de imágenes ópticas *in vivo*^[60].

Si bien la encapsulación en este tipo de micelas ha demostrado ser una estrategia eficaz para mejorar la solubilidad, la estabilidad y el desempeño fotodinámico de fotosensibilizadores, otros sistemas micelares poliméricos han sido ampliamente explorados debido a su versatilidad estructural y comportamiento favorable en medios biológicos. En este contexto, los copolímeros tipo Pluronic emergen como plataformas de encapsulación particularmente atractivas para aplicaciones biomédicas.

Pluronic F-127^[61] (12.600 g/mol), es un copolímero tribloque sintético y no iónico que forma nanoestructuras autoensambladas de tipo micelar en medios acuosos. Este polímero posee un núcleo hidrofóbico constituido por PPO (*poly(propylene oxide)*) y una corona hidrofílica formada por PEO (*poly(ethylene oxide)*), permitiendo encapsular y transportar compuestos hidrofóbicos dentro de su núcleo. Adicionalmente, Pluronic F-127 puede formar hidrogeles sensibles a la temperatura y al pH, características que lo convierten en un material ampliamente utilizado en sistemas de liberación de fármacos^[62].

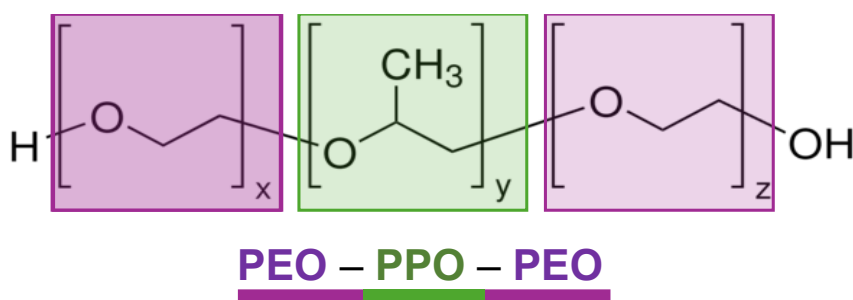


Figura 20. Representación de la estructura tribloque del copolímero Pluronic F-127, compuesto por dos segmentos hidrofílicos de polietilenglicol (PEO) en los extremos y un bloque central hidrofóbico de polipropilenglicol (PPO). Esta disposición PEO–PPO–PEO confiere al polímero su capacidad para formar micelas en solución acuosa y encapsular moléculas hidrofóbicas, facilitando su solubilización y estabilización.

Estas propiedades han motivado el uso extensivo de Pluronic F-127 como plataforma para la encapsulación de fotosensibilizadores (véase Tabla 5), particularmente en el contexto de la terapia fotodinámica, donde la solubilidad, estabilidad y biodisponibilidad del agente activo resultan determinantes para su eficacia terapéutica.

Tabla 5. Resumen de estudios reportados en la literatura sobre la encapsulación de fotosensibilizadores utilizando Pluronic F-127. La tabla presenta, para cada fotosensibilizador, el objetivo del uso de F-127 y el método de encapsulación empleado, que incluye procedimientos como

disolución en solventes orgánicos o acuosos y evaporación de solventes (film), ultrasonificación, rehidratación, cromatografía de exclusión y filtración estéril:

Fotosensibilizador	Objetivo del uso de F-127	Método de encapsulación
Paclitaxel + Lapatinib ^[63]	Facilitar entrada a la célula de ambos fármacos y superar la resistencia tumoral.	1. Disolver F-127, PTX y LPT en acetonitrilo. 2. Evaporar solvente (film). 3. Hidratar 60 °C, 30 min. 4. Filtrar 0.22 µm y liofilizar.
AICIPc ^[64]	Facilitar entrada a la célula y prevenir agregación del PS.	1. Disolver F-127 en PBS y Fs en etanol. 2. Preparar F-127/AICIPc sin dilución con ultrasonido por 2 minutos, almacenar 48 hrs en oscuridad. 3. Incubar 2 h con A549. 4. Evaluar internalización por citometría..
Complejo [Ru(bis-methoxystyryl-bipy) ₃] ²⁺ ^[65]	Aumentar solubilidad en agua y biocompatibilidad.	1. Mezclar fase orgánica (Ru en DCM) con fase acuosa (F-127). 2. Ultrasonido. 3. Evaporar DCM. 4. Cromatografía de exclusión.
Curcumina (Cur) encapsulada en Pluronic F-127 ^[66]	Mejorar solubilidad, estabilidad y actividad fotodinámica.	1. Disolver Cur y F-127 en cloroformo. 2. Evaporar solvente (film). 3. Rehidratar en mili-q bajo agitación por 30 min. 4. Homogeneizar por 2 minutos a 15500 rpm.
Hypericin (F-127/HYP) para cáncer de mama triple negativo (TNBC) ^[67]	Mejorar solubilidad y efecto PDT selectivo en MDA-MB-231.	1. Disolver HYP y F-127 en etanol. 2. Evaporar. 3. Secar 24 h en desecador estéril. 4. Rehidratar en agua destilada, agitar 2 h. 5. Liofilizar y rehidratar en PBS antes de usar.
Rose Bengal (RB) + Copaifera oil (CO) ^[68]	Desarrollar emulgel termosensible para PDT tópica.	1. Disolver Carbopol en agua (5 h). 2. Añadir F-127/F-68 (5 °C overnight). 3. Neutralizar con TEA. 4. Incorporar RB y CO.
Porfirinas catiónicas– Erlotinib ^[69]	Mejorar solubilidad y selectividad frente a Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico.	1. Disolver porfirina en MeOH. 2. Mezclar con F-127 (2.5% p/v). 3. Evaporar solvente. 4. Secar al vacío. 5. Rehidratar en agua.

Estos antecedentes contextualizan el uso de Pluronic F-127 como sistema de encapsulación en el presente trabajo.

Capítulo 3

Problemática

Si bien existen fotosensibilizadores aprobados y capaces de ser eficaces en terapia fotodinámica, presentan un bajo rendimiento de absorción en el infrarrojo cercano^[16]. Se busca que los fotosensibilizadores absorban en el infrarrojo cercano, ya que, irradiar dentro de esta frecuencia no es dañino para la salud de las personas dentro de la ventana terapéutica, incluso tiene diversos efectos biológicos y aplicaciones médicas, como promover la curación de heridas^[70]. Además, el infrarrojo cercano permite una mayor penetración en los tejidos, lo que amplía el alcance terapéutico de la TFD y favorece su eficacia incluso en tumores localizados en zonas más profundas.

Hipótesis

Los complejos de Os(II) basados en ligandos fenantrolínicos que poseen fragmentos con extendida conjugación π - π propuestos en este proyecto presentarán una absorción que cubre la región visible/infrarrojo cercano y un alto rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete. En consecuencia, actuarán como eficientes fotosensibilizadores para terapia fotodinámica contra la línea de células cancerosas de mama, MCF-7.

Objetivo general

Sintetizar y caracterizar una serie de complejos de Os(II) basados en ligandos fenantrolínicos con extendida conjugación π - π , para evaluar su fototoxicidad contra línea de células de cáncer de mama MCF-7 *in vitro* en cultivos 2D como modelo para TFD.

Objetivos específicos

- ✓ Sintetizar, purificar y caracterizar ligandos y complejos de Os(II) mediante cromatografía en columna y ¹H-RMN.
- ✓ Caracterización de las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de los complejos de Os(II): espectro de fotoluminiscencia en estado estacionario y resuelta en el tiempo, rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete y fotoestabilidad.
- ✓ Evaluar la efectividad de los complejos de Os(II) como fotosensibilizadores en terapia fotodinámica realizando ensayos de fototoxicidad en células cancerosas de mama MCF-7, cultivadas *in vitro*.
- ✓ Formular y evaluar económicamente los fotosensibilizadores de Os(II) con un enfoque de escalamiento del nivel de madurez de la tecnología, mediante un análisis cualitativo y cuantitativo orientados al desarrollo tecnológico.

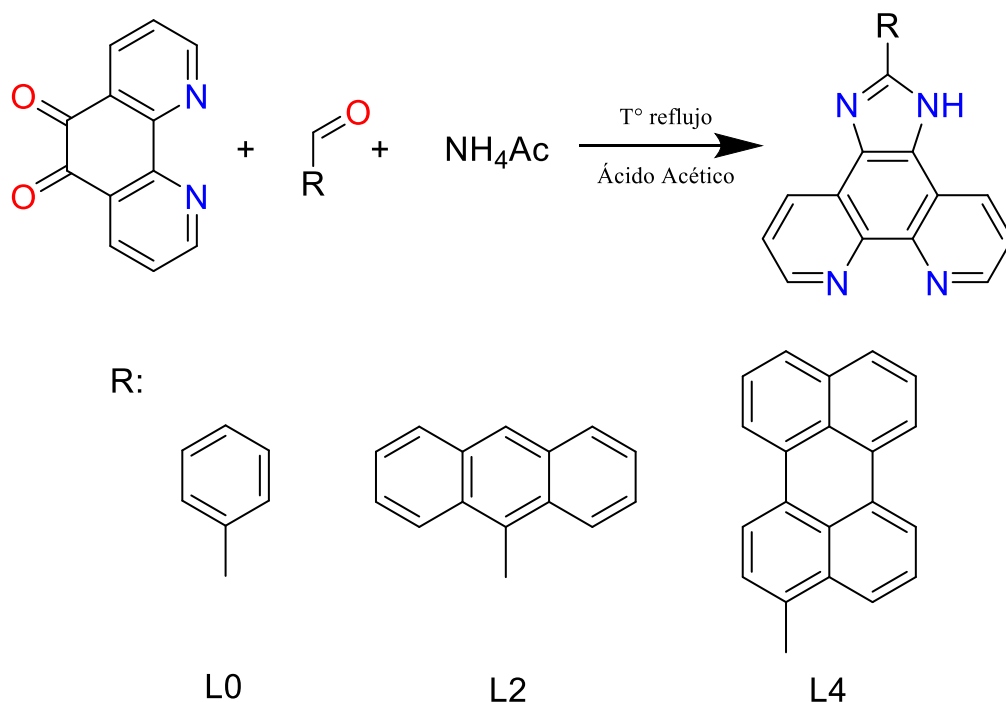
Capítulo 4

Metodología y resultados

Parte I: Síntesis, purificación y caracterización de los complejos de Os(II)

A continuación, se describen los métodos y procedimientos a seguir para llevar a cabo la investigación según lo revisado en la literatura^[18]:

1. Síntesis y caracterización de los ligandos L0, L2, L4



Esquema 1. Esquema general de síntesis de los ligandos L0, L2 y L4 mediante la unión de 1,10-fenantrolina-5,6-diona, un aldehído aromático (R-CHO) y acetato de amonio (NH₄Ac) en condiciones de reflujo en ácido acético. La reacción permite la formación de ligandos fenantrolínicos, donde el sustituyente R define cada ligando sintetizado: L0 (grupo fenilo), L2 (grupo antraceno) y L4 (grupo perileno).

1.1 Síntesis ligando L0

Se agrega 1,10-fenantrolina-5,6-diona (0,5 g, 210,19 g/mol), benzaldehído (0,25 g, 106,12 g/mol) y acetato de amonio (1,83 g, 77,08 g/mol) a un balón de 100 mL con 25 mL de ácido acético y se deja a reflujo por 5 horas bajo atmósfera inerte. Luego, el recipiente con la mezcla se deja sobre hielo y se neutraliza con NH₄OH, finalmente se filtra y lava con abundante agua y se deja secar al aire por 5 días.

1.2 Síntesis ligando L2

Se agrega 1,10-fenantrolina-5,6-diona (0,71254 g, 210,19 g/mol), 9-antralaldehído (0,7 g, 206,24 g/mol) y acetato de amonio (3,93 g, 77,08 g/mol) a un balón de 100 mL con 30 mL de ácido acético y

se deja a reflujo por 8 horas bajo atmósfera inerte. Luego se obtiene un precipitado amarillo, que es filtrado y lavado con abundante agua y se deja en la estufa a vacío.

1.3 Síntesis ligando L4

Se agrega 1,10-fenantrolina-5,6-diona (0,5 g, 210,19 g/mol), 3-perylene carboxaldehyde (0,4 g, 280,3 g/mol) y acetato de amonio (1,9 g, 77,08 g/mol) a un balón de 100 mL con 30 mL de ácido acético y se deja a reflujo por 4 horas bajo atmósfera inerte. Luego, el recipiente con la mezcla se deja sobre hielo y se agrega NH_3 partiendo con 25 mL hasta llegar a un pH neutro, se filtra a vacío con abundante agua y se deja en la estufa a vacío.

2. Caracterización de los ligandos L0, L2, L4

2.1 ^1H -RMN del ligando L0

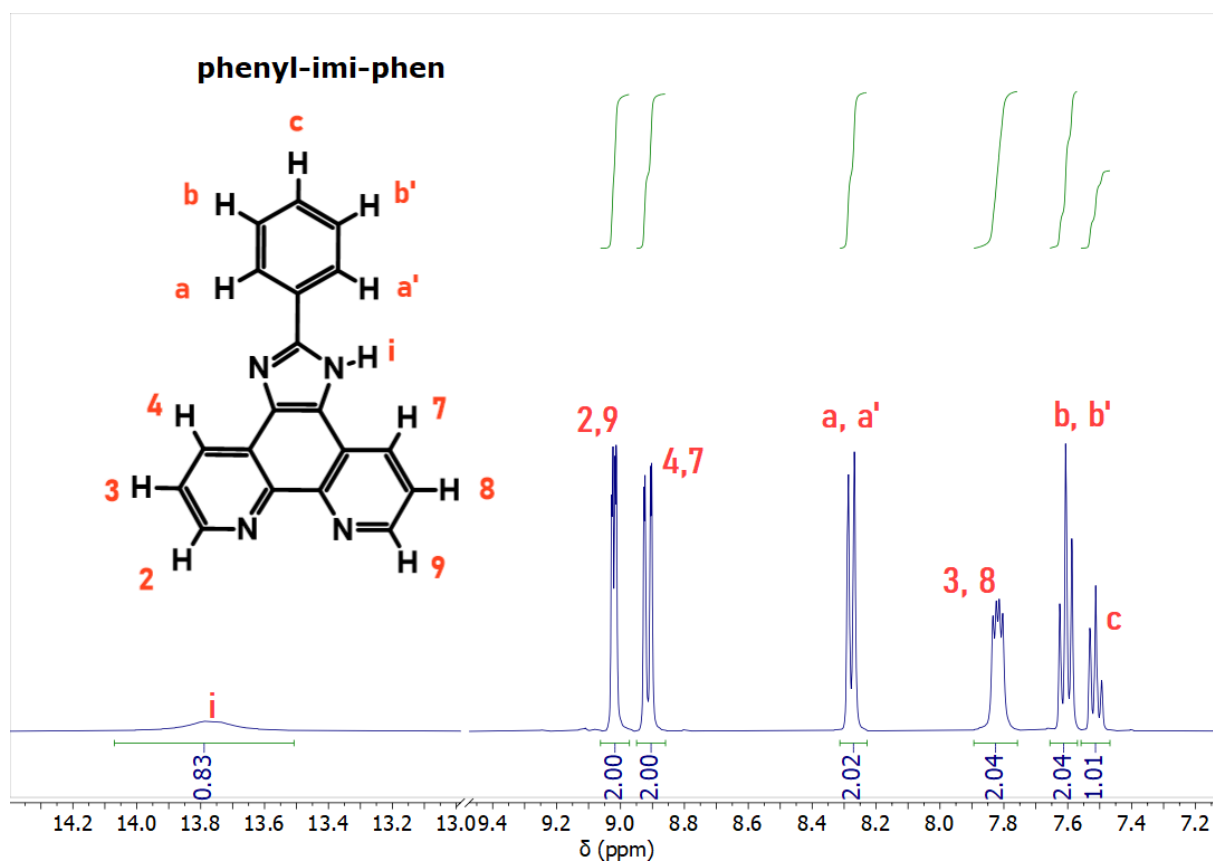


Figura 21. Espectro de ^1H -RMN del ligando L0, junto con la estructura molecular y la asignación de cada protón. La señal más desfasada hacia campo bajo corresponde al protón N-H (i), ubicado alrededor de 13,8 ppm. En la región entre 9,2 y 8,2 ppm se observan las señales de los protones del sistema fenantrolínico (2,9 y 4,7). Finalmente, entre 8,2 y 7,6 ppm aparecen los conjuntos aromáticos del fenilo (a, a'; b, b'). La concordancia entre la estructura y el espectro confirma la pureza del ligando de manera preliminar.

2.2 ^1H -RMN del ligando L2

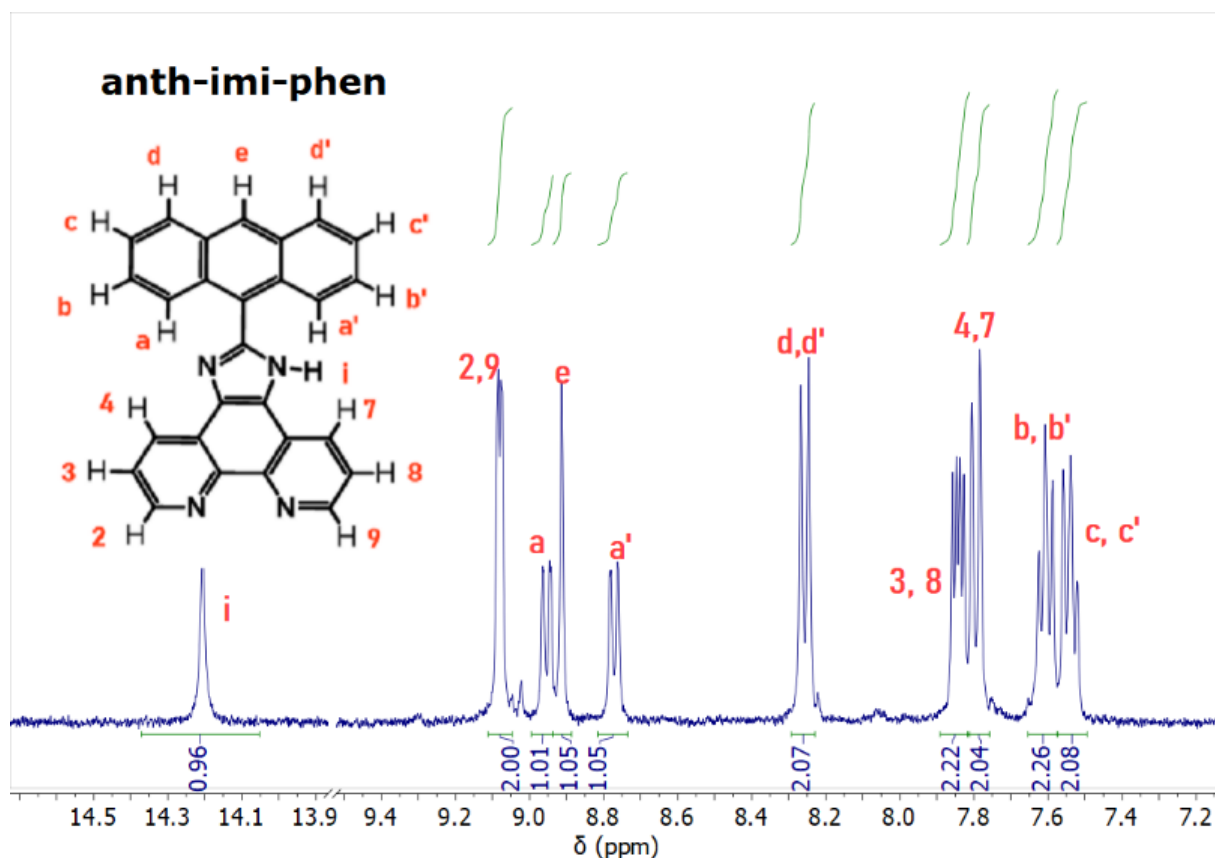


Figura 22. Espectro de ^1H -RMN del ligando L2, junto con la estructura molecular y la asignación de cada protón. La señal más desfasada hacia campo bajo corresponde al protón N-H (i), ubicado aproximadamente en 14,3 ppm. En la región entre 9,2 y 8,6 ppm se observan las señales de los protones del sistema fenantrolínico (2,9 y 4,7). Finalmente, entre 8,3 y 7,3 ppm aparecen los conjuntos aromáticos correspondientes tanto al antraceno (d, d') como al anillo fenilo (a, a'; b, b'; c, c'). La concordancia entre la estructura y el espectro confirma la pureza del ligando de manera preliminar.

2.3 ^1H -RMN del ligando L4

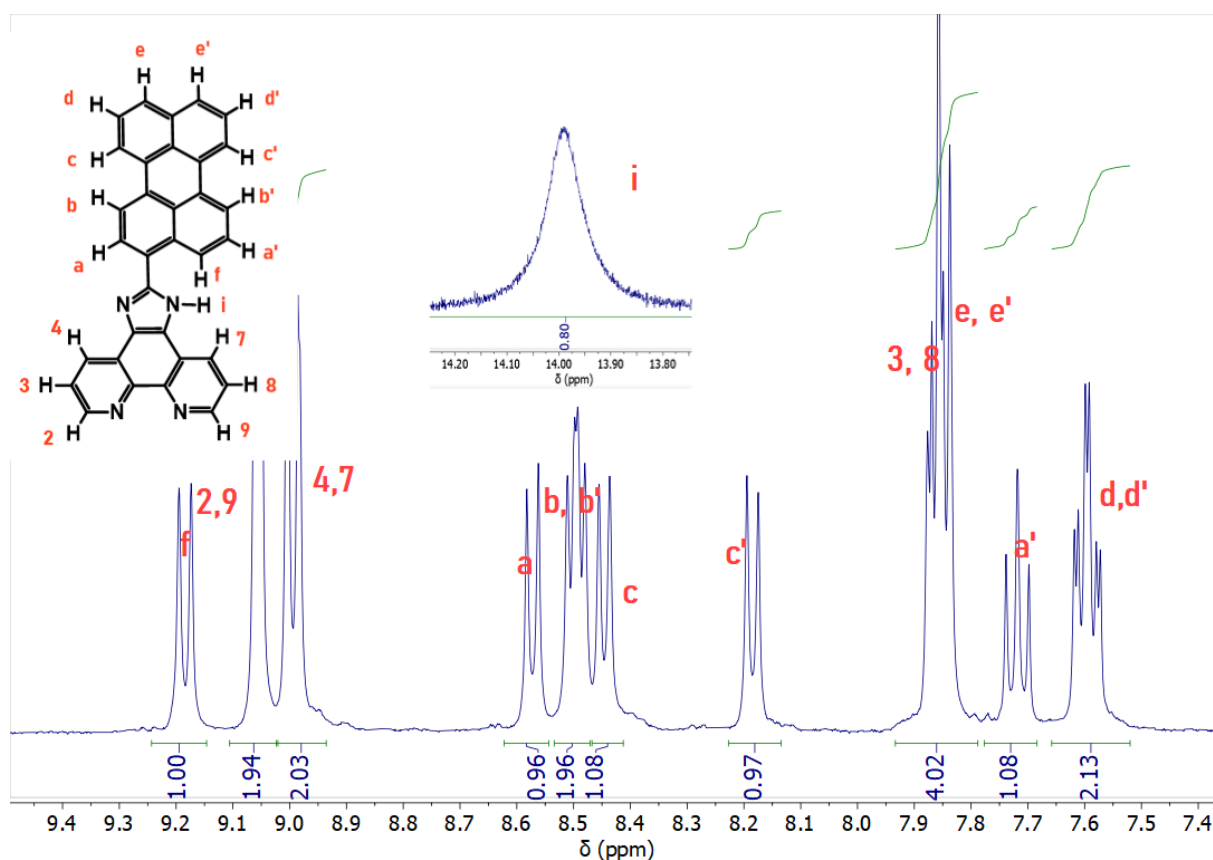
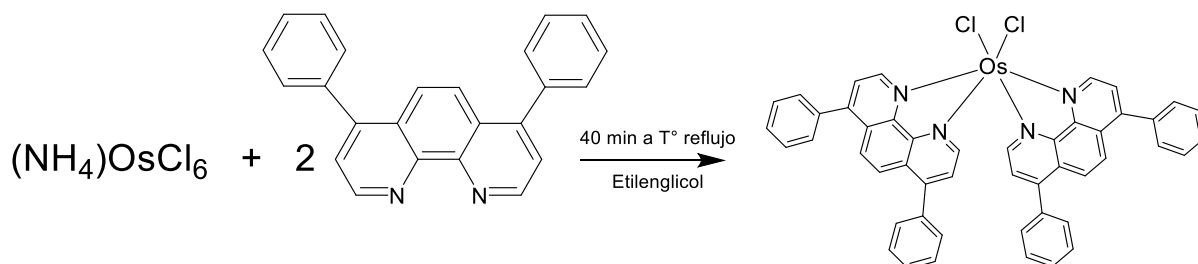


Figura 23. Espectro de ^1H -RMN del ligando L4, acompañado de su estructura molecular y la asignación de cada protón. La señal más desfasada hacia campo bajo corresponde al protón N-H (i), cuya ampliación se muestra en el recuadro central, ubicado alrededor de 14,0 ppm. En la región entre 9,3 y 8,9 ppm se observan los protones del sistema fenantrolínico (2,9 y 4,7), junto con la señal del protón f. Entre 8,6 y 8,0 ppm aparecen las señales aromáticas del anillo fenilo (a, b, b', c, c'), mostrando las multiplicidades esperadas para sustitución asimétrica. Finalmente, en la región entre 7,9 y 7,5 ppm se identifican los protones aromáticos del antraceno (e, e'; d, d'). El espectro es consistente con la estructura propuesta y confirma la pureza del ligando.

3. Síntesis del complejo Osbato^[71].



Esquema 2. Esquema de síntesis del complejos Osbato, donde el precursor $(\text{NH}_4)_2\text{OsCl}_6$ reacciona con dos equivalentes de batofenantrolina en etilenglicol bajo condiciones de reflujo durante 40 minutos. Este proceso da lugar a la formación del complejo octaédrico $\text{Os}(\text{II})$ coordinado por dos ligandos polipiridinos y dos átomos de cloro.

La síntesis de $\text{Os}(\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{N}_2)_2\text{Cl}_2$ se realizó siguiendo una referencia que establece un tiempo máximo de reacción de 40 minutos, ya que prolongar este periodo favorece la formación de subproductos no identificados. Mantener este límite es esencial para evitar subproductos que complican la etapa de purificación^[71].

Se añadió $(\text{NH}_4)_2\text{OsCl}_6$ (0,2 g, $4,55 \times 10^{-4}$ mol) a 4,7 – diphenyl – 1,10 – phenanthroline (0,3029 g, $9,11 \times 10^{-4}$ mol) en etilenglicol (10 mL) y se calentó a reflujo en una atmósfera inerte durante 40 minutos. Después de finalizar la reacción, se deja a temperatura ambiente por 30 minutos y a la mezcla resultante se le añadió una solución acuosa (30 mL) de ditionito de sodio (3,43 g), se deja 15 minutos con agitación y en atmósfera inerte. Se deja en el refrigerador por 1 hora a -2°C . El precipitado resultante se filtró al vacío y se lavó con agua desionizada (50 mL) tres veces y éter (50 mL) dos veces. Se deja en la estufa al vacío por 24 horas a 40°C . Rendimiento (0,42 g, $4,69 \times 10^{-4}$ mol, 97,35%). Este compuesto será nombrado como Osbato con una masa molar de 925,9215 g/mol.

4. Purificación y caracterización del complejo Osbato.

4.1 Espectro de ^1H -RMN Osbato.

De forma preliminar, se realizó una cromatografía del compuesto, obteniendo dos fracciones: una de color morado y otra de color café. Ambas presentan impurezas no identificadas, evidenciadas mediante ^1H -RMN, ya que en ninguna fracción la cantidad de protones del espectro coincidía con la cantidad de protones de la molécula.

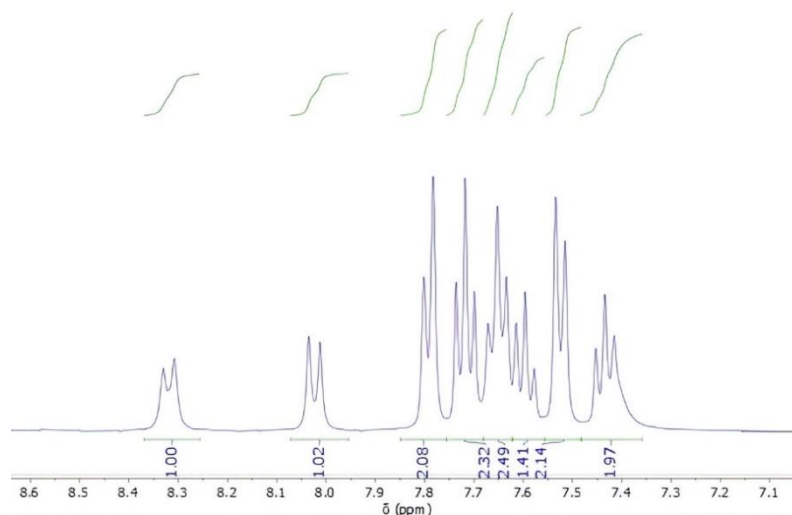


Figura 24. Espectro de ^1H -RMN Osbato Fracción 1.

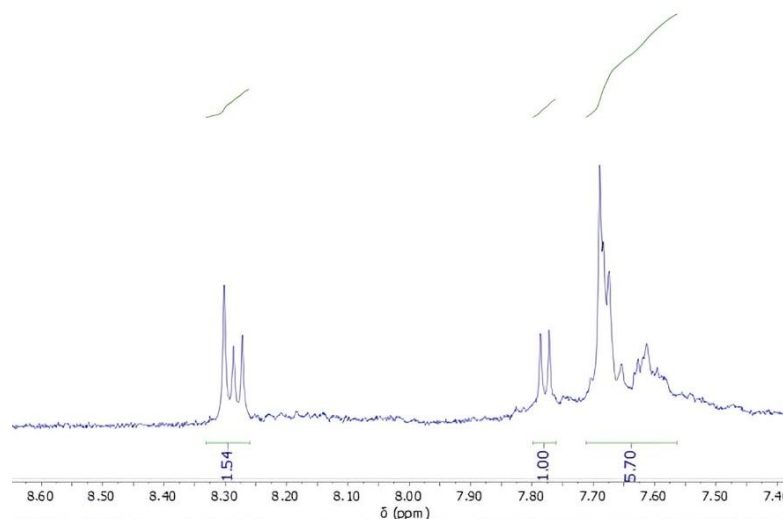
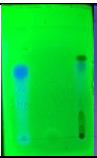
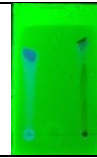
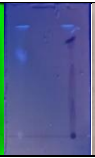
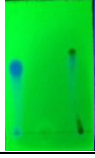
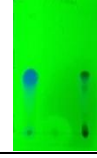
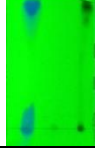


Figura 25. Espectro de ^1H -RMN Osbato Fracción 2.

4.2 Cromatografía de Osbato.

Como los espectros de RMN dan más señales de las que debiesen ser, se realiza cromatografía del compuesto en placas TLC, utilizando como fase estacionaria alumina neutra y una prueba de diferentes combinaciones entre acetonitrilo (ACN) y tolueno (TOL) como fase móvil para separar las impurezas del compuesto.

Tabla 6. Placas de cromatografía en capa fina (TLC) obtenidas utilizando diferentes relaciones de acetonitrilo:tolueno como fase móvil. Cada condición se muestra con tres imágenes: bajo luz UV verde (izquierda), luz UV azul (centro) y luz visible (derecha). Se evaluaron proporciones desde 1:3 hasta 5:1 con el objetivo de identificar la condición que proporciona mejor separación de las manchas asociadas al compuesto de interés y a sus posibles impurezas:

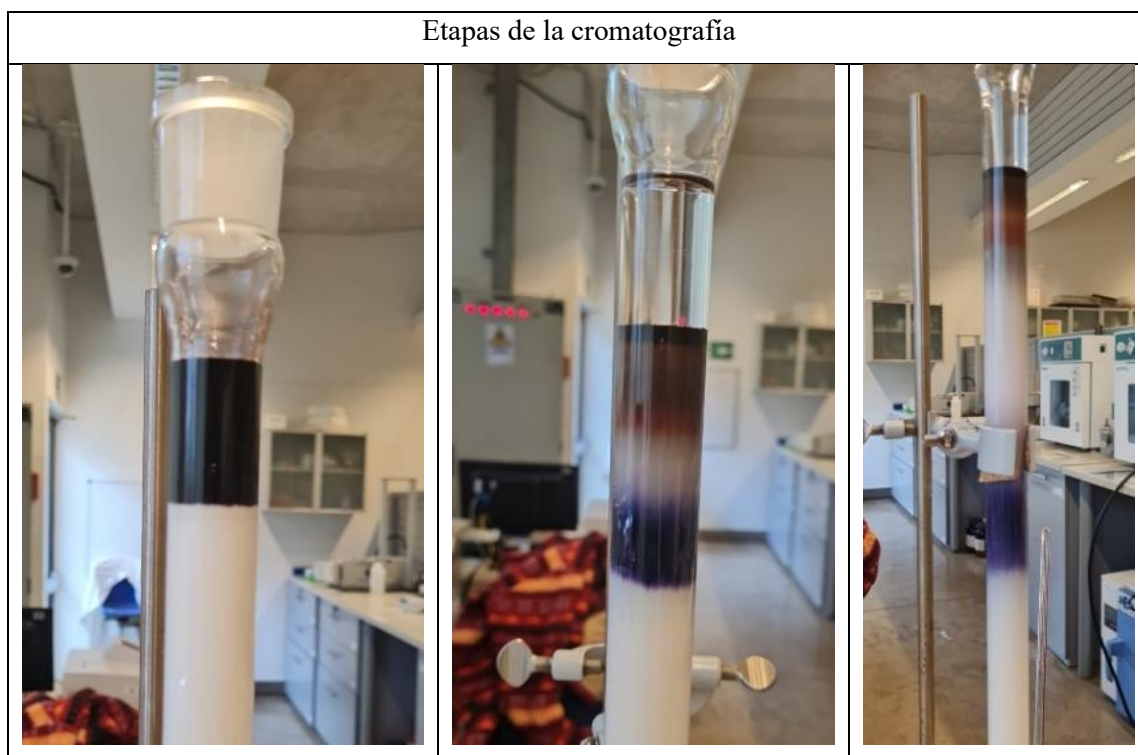
Acetonitrilo:Tolueno 1:3		
		
Acetonitrilo:Tolueno 1:1	Acetonitrilo:Tolueno 1:2	
		
Acetonitrilo:Tolueno 1:4	Acetonitrilo:Tolueno 1:5	
		
Acetonitrilo:Tolueno 2:1	Acetonitrilo:Tolueno 3:1	
		
Acetonitrilo:Tolueno 4:1	Acetonitrilo:Tolueno 5:1	
		

Es importante señalar que la primera placa se observa de color verde cuando se irradia con una longitud de onda de 254 nm correspondiente a una onda corta de ultravioleta, cuando se ve de color azul se irradia con una longitud de onda de 365 nm correspondiente a una onda larga de ultravioleta y cuando es blanca la placa está es observada con luz natural. Además, dentro de las placas, la primera señal observada corresponde a la batofenantrolina, el compuesto del medio a $(NH_4)_2OsCl_6$ y la última señal corresponde al compuesto Osbato. Este análisis se realizó con el objetivo de comparar las señales

y determinar si la síntesis fue correcta o si, por el contrario, no se produjo la coordinación entre ambos compuestos. En efecto, Osbato exhibe señales similares a las de la batofenantrolina, junto con señales propias adicionales, lo que confirma que la síntesis fue exitosa.

Finalmente, se determina que la mejor fase móvil para separar las impurezas es la proporción 1:3 de acetonitrilo y tolueno para realizar una cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria alumina neutra, luego las interacciones moleculares entre ambas fases y el compuesto Osbato permiten que se separe claramente una fracción morada de las impurezas (véase Tabla 7).

Tabla 7. *Etapas de la cromatografía en columna utilizando una fase móvil 1:3 acetonitrilo:tolueno. Las imágenes muestran el progreso de la separación a medida que la mezcla avanza a través de la columna. En la primera imagen se observa la carga inicial del compuesto sobre la fase estacionaria, con una banda oscura compacta situada en la parte superior. En la segunda imagen, la banda comienza a desplazarse y a fraccionarse, evidenciando la separación diferencial de los componentes según su polaridad y afinidad por la fase móvil. En la tercera imagen, las bandas coloreadas se encuentran más definidas y desplazadas a lo largo de la columna, indicando una separación más avanzada donde el compuesto que primero sale corresponde a Osbato puro. Estas etapas permiten visualizar el desarrollo progresivo de la cromatografía:*



Al finalizar este procedimiento, se obtiene un **rendimiento del 16,15%**, ya que en un principio se tenía 0,4229 gramos del compuesto $Os(C_{24}H_{16}N_2)_2Cl_2$ y se obtiene al finalizar un total de 0,0703 gramos.

4.3 Cristalización de Osbato.

Al obtener la fracción morada pura, se realiza una cristalización por fases. El compuesto obtenido se solubiliza en diclorometano (DCM), se deposita en tubos de ensayo y se agrega suavemente, con una pipeta Pasteur, hexano. La muestra se deja en oscuridad por 24 horas, período suficiente para observar formación de cristales (véase *Figura 26*).



Figura 26. Cristales del compuesto $Os(C_{24}H_{16}N_2)_2Cl_2$ puro.

Al cumplirse dos semanas, se forman estructuras cristalinas más rígidas del compuesto Osbato purificado (véase *Figura 27*). Es importante destacar que la formación de cristales es un indicio de que el compuesto efectivamente está libre de impurezas^[72].



Figura 27. Cristales del compuesto Osbato purificado.

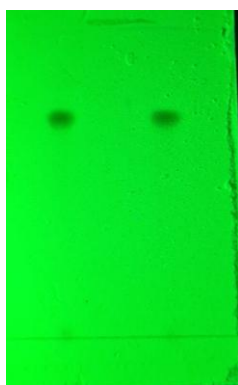
4.4 Factor de retención de Osbato.

El factor de retención (R_f) es un parámetro fundamental en la cromatografía en capa fina (TLC) que permite evaluar el desplazamiento relativo de un compuesto sobre la placa. Se define como la relación

entre la distancia recorrida por la sustancia y la distancia alcanzada por el frente del disolvente durante la elución^[73]:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$$

A partir de la cromatografía en columna realizada y de la obtención de la fracción morada pura, se puede obtener el siguiente factor de retención del compuesto:



Factor de retención

$$Rf = \frac{3,9}{4,1} = 0,95$$

Figura 28. Placa de cromatografía en capa fina utilizada para determinar el factor de retención (R_f) del compuesto Osbato purificado. La imagen muestra una única mancha fluorescente correspondiente al compuesto, junto con la medición de las distancias recorridas por la sustancia (3,9 cm) y por el frente del solvente (4,1 cm). A partir de estos valores se obtiene un R_f de 0,95, lo que indica un desplazamiento casi completo hacia el frente de la fase móvil. La presencia de una única señal bien definida sugiere que el compuesto se encuentra en estado puro.

El valor de R_f es un parámetro útil para verificar la presencia de impurezas. En este caso, al observar una única señal en la placa con un R_f de 0,95, se evidencia que todo el compuesto avanza de manera uniforme, lo que constituye un indicador sólido de su pureza.

4.5 Espectro de ^1H -RMN Osbato.

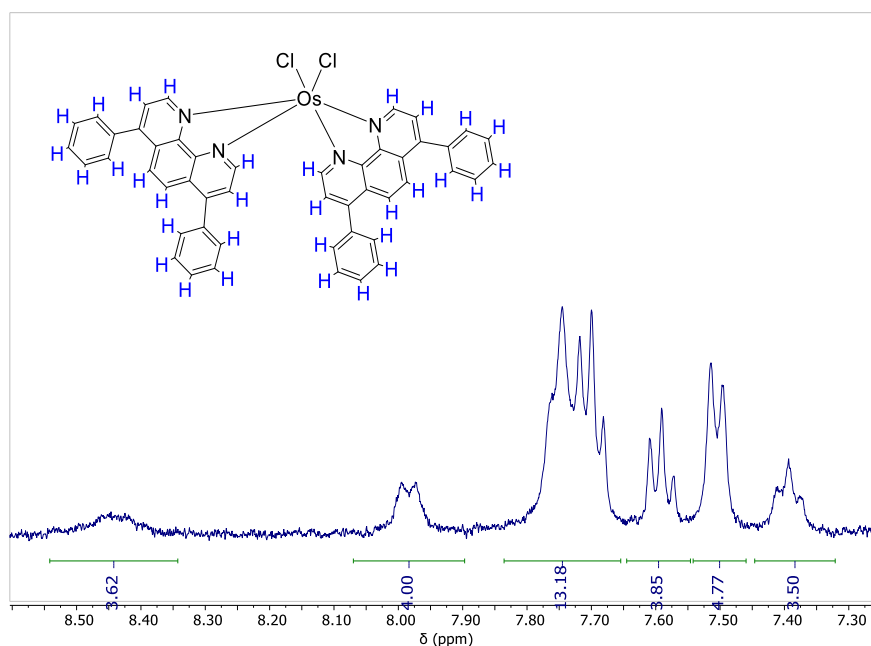
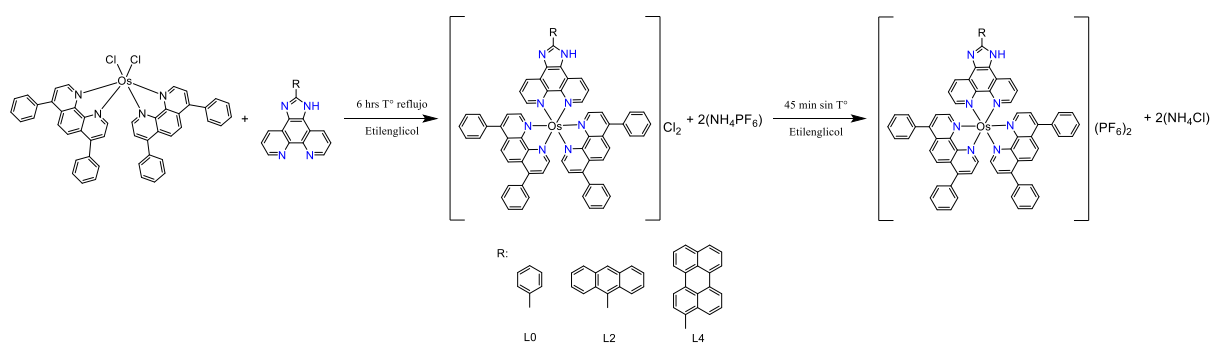


Figura 29. Espectro de ^1H -RMN del complejo de Os(II) con ligandos polipiridínicos, acompañado de la estructura molecular con la asignación de cada protón aromático. En la región comprendida entre 8,6 y 7,3 ppm se observan las 32 señales correspondientes a los 32 protones del complejo, cuya presencia completa y bien definida confirma que todos los hidrógenos esperados para la estructura propuesta están representados en el espectro. La coincidencia exacta entre el número de señales observadas y el número teórico de protones constituye evidencia sólida de su pureza química y de la correcta formación del complejo metálico.

5. Síntesis de los complejos de Osmio (II) basados en ligandos fenantrolínicos con extendida conjugación π - π .



Esquema 3. Esquema de síntesis de los complejos de Os(II) polipiridínicos. El precursor Osbato reacciona con los ligandos L0, L2 y L4 bajo reflujo en etilenglicol para formar el complejo intermedio. Posteriormente, la sustitución de los cloruros mediante NH_4PF_6 produce el complejo final correspondiente a OsL0, OsL2 y OsL4.

5.1 Síntesis OsL0.

Se añadieron, en una proporción 1:3, $Os(C_{24}H_{16}N_2)_2Cl_2$ (0,0678 g, $7,3224 \times 10^{-5}$ mol) a L_0 (0,0651 g, $2,1967 \times 10^{-4}$ mol), en etilenglicol (10 mL) y se calentó a reflujo en una atmósfera inerte durante 6 horas. Después de finalizar la reacción, a la mezcla resultante se le añadió una solución acuosa (10 mL) de NH_4PF_6 (0,1114 g). Se deja en el refrigerador por 24 horas a -2 °C. El precipitado resultante se centrifugó con agua desionizada (50 mL) por 15 minutos tres veces y hexano (50 mL) por 15 minutos, 3 veces. Se deja en la estufa al vacío por 24 horas a 40°C. El rendimiento de la síntesis del producto crudo fue de 94% (0,0991 g, $7,3224 \times 10^{-5}$ mol, 93,93%). Este complejo será llamado OsL0 con una masa molar de 1441,27566 g/mol.

5.2 Síntesis OsL2.

Se añadió, en una proporción 1:1, $Os(C_{24}H_{16}N_2)_2Cl_2$ (0,0603 g, $6,5124 \times 10^{-5}$ mol) a L_2 (0,0258 g, $6,5124 \times 10^{-5}$ mol) en etilenglicol (10 mL) y se calentó a reflujo en una atmósfera inerte durante 6 horas. Después de finalizar la reacción, a la mezcla resultante se le añadió una solución acuosa (10 mL) de NH_4PF_6 (0,1114 g). Se deja en el refrigerador por 24 horas a -2 °C. El precipitado resultante se centrifugó con agua desionizada (50 mL) por 15 minutos tres veces y hexano (50 mL) por 15 minutos, 3 veces. Se deja en la estufa al vacío por 24 horas a 40°C. El rendimiento de la síntesis del producto crudo fue de 99% (0,1014 g, $6,5124 \times 10^{-5}$ mol, 98,82%). Este complejo será llamado OsL2 con una masa molar de 1541,38566 g/mol.

5.3 Síntesis OsL4.

Se añadió, en una proporción 1:1, $Os(C_{24}H_{16}N_2)_2Cl_2$ (0,0603 g, $6,5124 \times 10^{-5}$ mol) a L_4 (0,0306 g, $6,5124 \times 10^{-5}$ mol) en etilenglicol (10 mL) y se calentó a reflujo en una atmósfera inerte durante 6 horas. Después de finalizar la reacción, a la mezcla resultante se le añadió una solución acuosa (10 mL) de NH_4PF_6 (0,1114 g). Se deja en el refrigerador por 24 horas a -2 °C. El precipitado resultante se centrifugó con agua desionizada (50 mL) por 15 minutos tres veces y hexano (50 mL) por 15 minutos, 3 veces. Se deja en la estufa al vacío por 24 horas a 40°C. El rendimiento de la síntesis del producto crudo fue de 87% (0,091 g, $6,5124 \times 10^{-5}$ mol, 86,5%). Este complejo será llamado OsL4.

6. Purificación y caracterización de los complejos de Osmio (II)^[74].

Se realiza cromatografía en placa TLC de los compuestos utilizando como fase estacionaria alumina y utilizando diferentes fases móviles.

Tabla 8. Placas de cromatografía en capa fina (TLC) de los compuestos OsL0, OsL2 y OsL4 (de izquierda a derecha en cada placa) evaluados en distintas fases móviles. Cada condición se muestra bajo luz UV verde, luz UV azul y luz visible. La comparación entre las fases móviles permite identificar las condiciones con mayor poder de resolución para distinguir entre los tres derivados de osmio.

63% ACN / 27% DCM / 10% MeOH			100% MetOH		
100% ACN			70% ACN / 30% MetOH		

6.1 Purificación y caracterización del complejo OsL0.

6.1.1 Cromatografía del complejo OsL0.

Se realiza cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria alumina dispersa en hexano y como fase móvil una mezcla de ACN y DCM en una proporción 1:1, donde se separa una fracción café como se observa en la siguiente imagen.

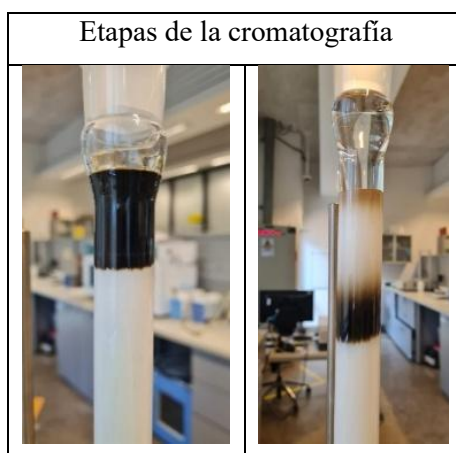


Figura 30. Etapas del proceso de cromatografía en columna utilizando una fase móvil 1:1 Acetonitrilo:Diclorometano. En la primera imagen se observa la carga inicial sobre la fase

estacionaria. En la segunda imagen se aprecia el inicio de la separación de los componentes a medida que la fase móvil desplaza la muestra a través de la columna.

Al finalizar esta cromatografía, se rotavapora el compuesto, se deja en la estufa a 40°C hasta el día siguiente y se obtiene un **rendimiento del 61,42%**.

6.1.2 ¹H-RMN del complejo OsL0.

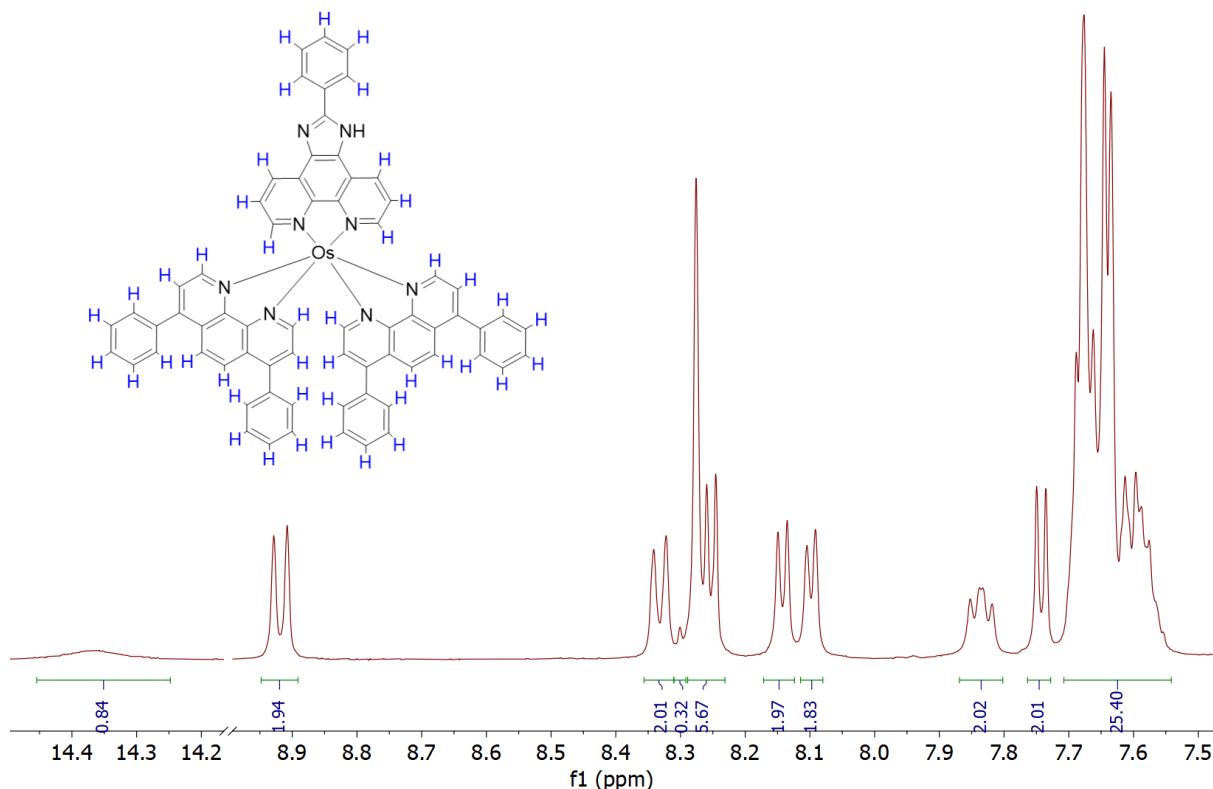


Figura 31. Espectro de ¹H-RMN del complejo OsL0, acompañado de la estructura molecular con la asignación de cada protón aromático. En la región de bajo campo se identifica la señal característica del protón N–H, ubicada entre 14,4 y 14,3 ppm. En el intervalo comprendido entre 8,9 y 7,5 ppm se observan las señales correspondientes a los protones aromáticos del ligando, las cuales suman un total de 44 protones, en completa concordancia con la estructura propuesta para el complejo OsL0. La coincidencia entre el número y la distribución de las señales esperadas y observadas confirma la correcta formación del complejo y respalda su pureza estructural.

6.2 Purificación y caracterización del complejo OsL2.

6.2.1 Cromatografía del complejo OsL2.

Se realiza cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria alumina dispersa en hexano y como fase móvil una mezcla de ACN y TOL en una proporción 1:3, y luego otra fase móvil de ACN Y DCM en una proporción 1:1. donde se separa una fracción café.

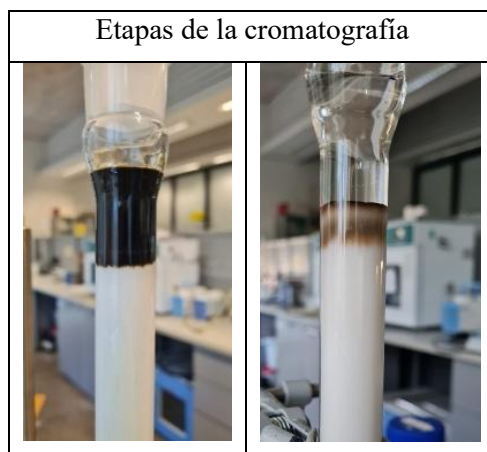


Figura 32. Etapas del proceso de cromatografía en columna utilizando una fase móvil 1:3 acetonitrilo:tolueno. En la primera imagen se observa la carga inicial sobre la fase estacionaria. En la segunda imagen se aprecia el inicio del proceso, con el estiramiento y aclaramiento progresivo de la banda a medida que los componentes comienzan a separarse bajo la acción de la fase móvil.

Al finalizar esta cromatografía, se rotavapora el compuesto, se deja en la estufa a 40°C hasta el día siguiente y se obtiene un **rendimiento del 54,48%**.

6.2.2 ^1H -RMN del complejo OsL2.

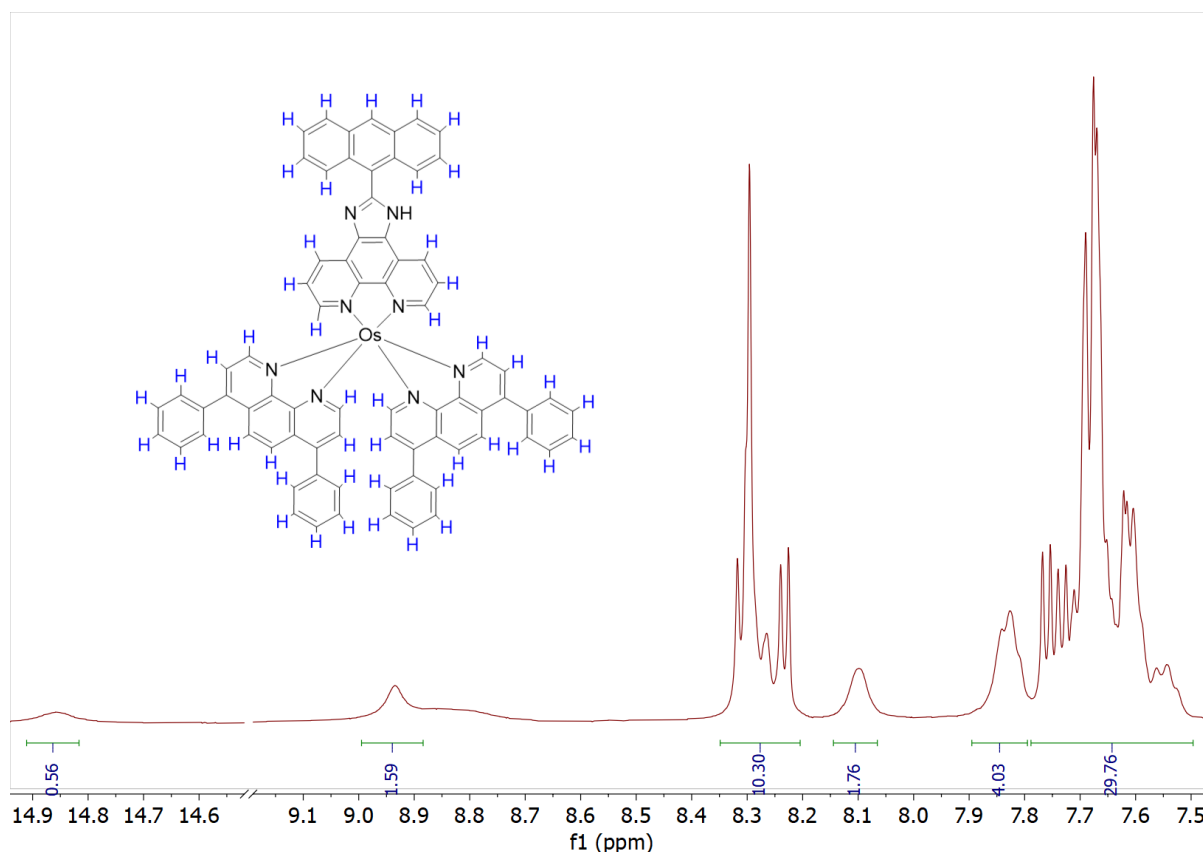


Figura 33. Espectro de ^1H -RMN del complejo OsL2, acompañado de su estructura molecular con la asignación de los protones aromáticos. En la región de muy bajo campo se observa la señal característica del protón N-H, ubicada entre 14,9 y 14,8 ppm. En el intervalo comprendido entre 8,9 y 7,5 ppm se distribuyen las señales correspondientes a los protones aromáticos del ligando L2, las cuales suman un total de 48 protones no equivalentes, valor que coincide completamente con el número esperado según la estructura propuesta. La concordancia entre las 48 señales observadas y las 48 señales teóricas, junto con la ausencia de señales adicionales, confirma la correcta formación del complejo y respalda su pureza estructural.

6.3 Purificación y caracterización del complejo OsL4.

6.3.1 Cromatografía del complejo OsL4.

Se realizan tres cromatografías en columna utilizando como fase estacionaria alumina dispersa en hexano. En la primera se utilizó 100% TOL, luego 1:3 ACN/TOL, después 1:1 ACN/DCM y finalmente 100% ACN. En la segunda cromatografía se utilizó 100% TOL y luego 100% ACN. Finalmente, en la última cromatografía en columna se utilizó 100% Metanol.

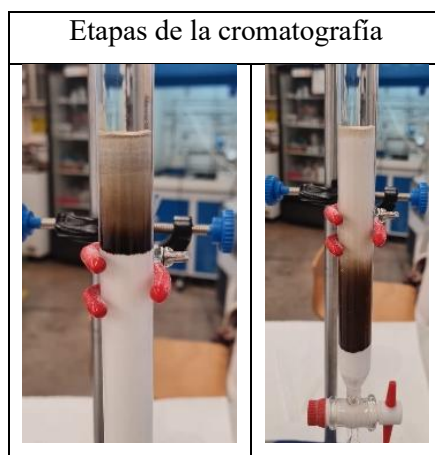


Figura 34. Etapas del proceso de cromatografía en columna utilizando una fase móvil 100% metanol. En la primera imagen se observa la banda inicial del compuesto cargado sobre la fase estacionaria. En la segunda imagen comienza a desplazarse y a separarse gradualmente a lo largo de la columna bajo la acción del metanol puro, evidenciando el inicio de la separación de los componentes presentes en la mezcla.

Al finalizar, se rotavapora el compuesto, se deja en la estufa a 40°C hasta el día siguiente y se obtiene un **rendimiento del 12,73%.**

Lamentablemente, este compuesto no pudo ser purificado, por lo que se decidió no continuar con su estudio en esta etapa por el tiempo requerido. No obstante, el análisis de la interacción entre el metal y este ligando representa un desafío interesante para futuras investigaciones, ya que podría aportar resultados innovadores.

7. Estudio propiedades fotofísicas de los complejos de Osmio (II)^[75].

7.1 Coeficiente de extinción de los complejos de Os(II) en acetonitrilo.

El coeficiente de extinción molar (ϵ) hace referencia a la capacidad de un complejo para absorber luz a una longitud de onda específica y se expresa en unidades de $M^{-1}cm^{-1}$. Un valor elevado de ϵ indica que la muestra absorbe fuertemente en esa longitud de onda, mientras que un valor bajo significa que apenas absorbe en esa longitud de onda^[76]. En el contexto de la terapia fotodinámica, es fundamental que el fotosensibilizador presente un coeficiente en la región visible/infrarrojo cercano (650–800 nm).

En el rango visible e infrarrojo cercano, los coeficientes de extinción molar evidencian diferencias entre el precursor y los complejos finales. Respecto al precursor OsbatO (véase *Figura 35*), su espectro presenta transiciones de alta energía en la región UV que no son relevantes para aplicaciones en TFD debido a su baja penetración tisular y al riesgo de causar daño colateral. En el rango de 600–800 nm se muestra una banda con un coeficiente de extinción máximo de $10,4 \times 10^3 M^{-1} \cdot cm^{-1}$, aunque sin exhibir la banda característica de transferencia de carga metal–ligando (MLCT) entre 400 y 500 nm, con un máximo en 500 nm y un ϵ de $14,52 \times 10^3 M^{-1} \cdot cm^{-1}$.

En contraste, los complejos OsL0 y OsL2 (véase *Figura 35*) sí muestran la banda MLCT entre 400 y 500 nm. En ambos casos se observa, además, una intensa absorción en torno a 300 nm, atribuida a transiciones intraligando ($\pi-\pi^*$) propias de sus sistemas aromáticos de los ligandos L0 y L2. Adicionalmente, ambos complejos presentan bandas en la región visible e incluso hacia el infrarrojo cercano (NIR), favorecida por el carácter de metal pesado del osmio, que favorece las transiciones prohibidas y observamos una banda de absorción de transferencia de carga metal-ligando del estado singlete al estado triplete entre 550-700 nm. Este comportamiento es consistente con lo reportado para otros sistemas basados en osmio, en los cuales también se observa la presencia de bandas MLCT^{[37]-[75]} en el mismo rango.

Una propiedad característica de un fotosensibilizador eficiente es tener un alto coeficiente de extinción molar en el rango de 600-800 nm^[77]. Los complejos de osmio cumplen con este criterio: en este rango, alcanzan un máximo en 600 nm, donde OsL0 alcanza un valor de coeficiente de extinción molar de $9,13 \times 10^3 M^{-1}cm^{-1}$, mientras que para OsL2 es $10,48 \times 10^3 M^{-1}cm^{-1}$.

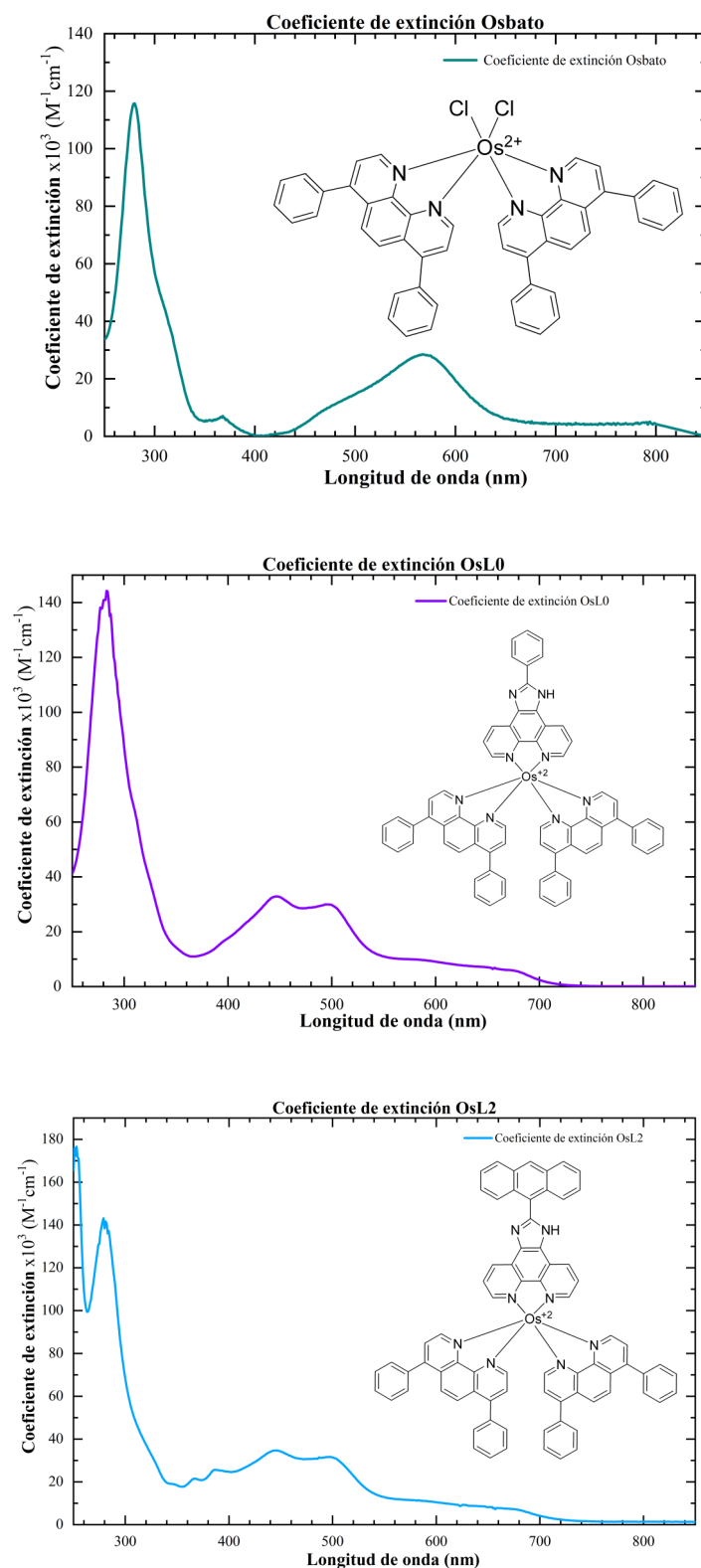


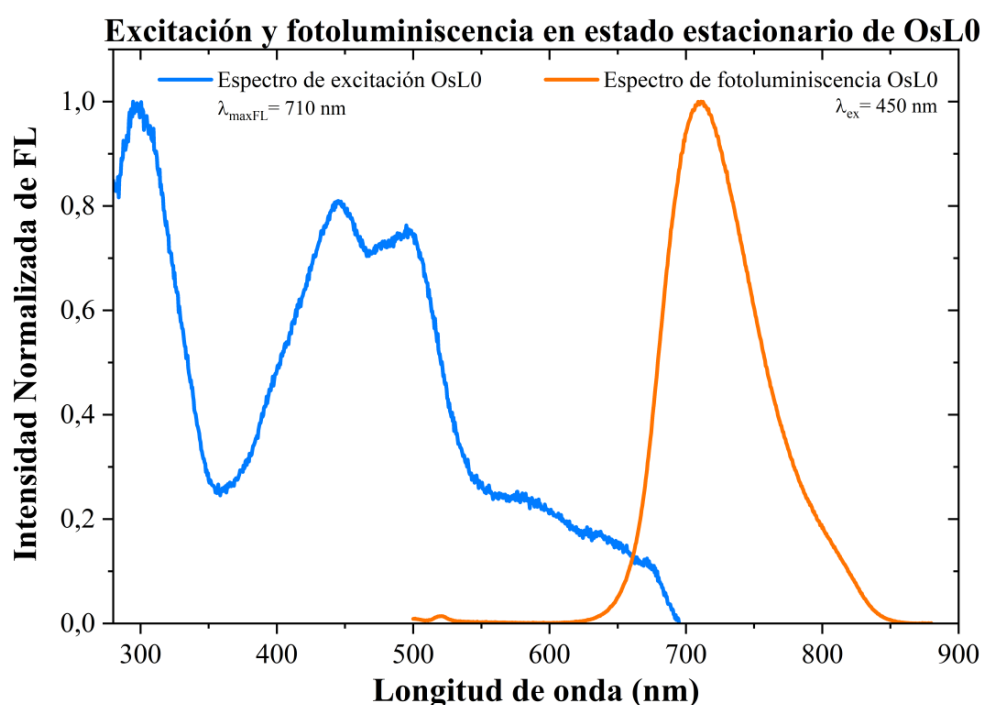
Figura 35. Coeficientes de extinción molar de los complejos Osbato, OsL0 y OsL2 registrados en acetonitrilo. Cada gráfico muestra la respuesta espectral característica de cada complejo, incluyendo su estructura molecular correspondiente. En todos los casos se observa una banda intensa de absorción en la región del UV (250–350 nm). El complejo Osbato presenta una banda dominante en torno a 300

nm, mientras que OsL0 y OsL2 exhiben perfiles espectrales similares, con absorciones amplias entre 280–380 nm correspondientes a los ligandos y bandas MLCT entre 400 y 550 nm. Además, ambos complejos muestran colas espectrales que se extienden hasta aproximadamente 600–700 nm. Las variaciones en la forma, posición e intensidad de estas bandas reflejan la influencia del grupo R en el sistema π -conjugado de los ligandos, modulando las transiciones electrónicas permitidas y, en consecuencia, el comportamiento fotoquímico de los complejos.

7.2 Medición de espectros de fotoluminiscencia en acetonitrilo.

Los espectros de excitación de los complejos OsL0 y OsL2 (Véase Figura 36) presentan similitudes con los espectros de absorción, con varias bandas de absorción con máximos destacados alrededor de 300 nm asociadas a transiciones intraligando (π - π^*), y una región amplia entre 450 y 550 nm correspondiente a MLCT^[78]. Esta información confirma que la fotoluminiscencia proviene del complejo como tal, con la participación directa del centro metálico, y no de impurezas, .

Los espectros de fotoluminiscencia en estado estacionario de ambos complejos muestran un máximo de emisión cercano a los 700 nm, ubicado en la región del infrarrojo cercano (NIR), una región ideal para bioimagen y terapia fotodinámica (PDT) por su elevada penetración en tejidos y bajo daño colateral.



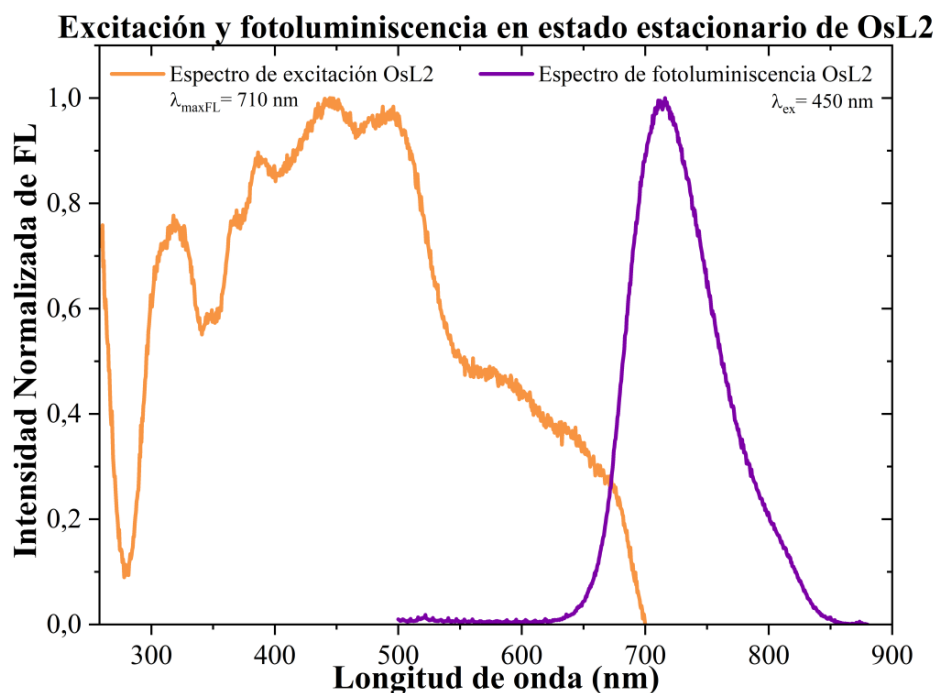


Figura 36. Espectros de excitación y fotoluminiscencia en estado estacionario de los complejos OsL0 y OsL2 registrados en acetonitrilo. Para OsL0 (arriba) y OsL2 (abajo), el espectro de excitación muestra varias bandas amplias en la región UV-visible (300–600 nm), mientras que el espectro de emisión presenta una banda intensa y bien definida en torno a 710 nm. En ambos casos, la excitación se registró a una longitud de onda de emisión de 710 nm, y la emisión a una longitud de onda de excitación de 450 nm. La coincidencia entre los perfiles de excitación y las bandas de absorción previas confirma la eficiencia del acoplamiento fotoactivo de los complejos y su capacidad para emitir en la región del rojo.

7.3 Medición del rendimiento cuántico de fotoluminiscencia (PL) .

El rendimiento cuántico de fotoluminiscencia Φ_{PL} se determinó utilizando como estándar de referencia el complejo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (Rubipy) en agua desoxigenada, con un valor de $\Phi = 0,063^{[79]}$, según la siguiente ecuación^[80]:

$$\phi_{\text{muestra}} = \phi_{\text{referencia}} \times \frac{\text{Área}_{\text{muestra}}}{\text{Área}_{\text{referencia}}} \times \frac{\eta_{\text{muestra}}^2}{\eta_{\text{referencia}}^2}$$

Bajo esta metodología, se obtuvo un Φ_{PL} de 3,4% para el complejo OsL0 y de 3,7% para el complejo OsL2, ambos medidos en acetonitrilo (CH_3CN). Estos valores se explican por las transiciones electrónicas prohibidas responsables de la emisión, asociadas a transiciones triplete-singlete^[81].

7.4 Medición del tiempo de vida de fotoluminiscencia.

El tiempo de vida de fotoluminiscencia (τ) representa cuánto dura el estado excitado triplete del complejo antes de volver al estado fundamental, emitiendo luz o relajándose por otros procesos no radiativos^[82].

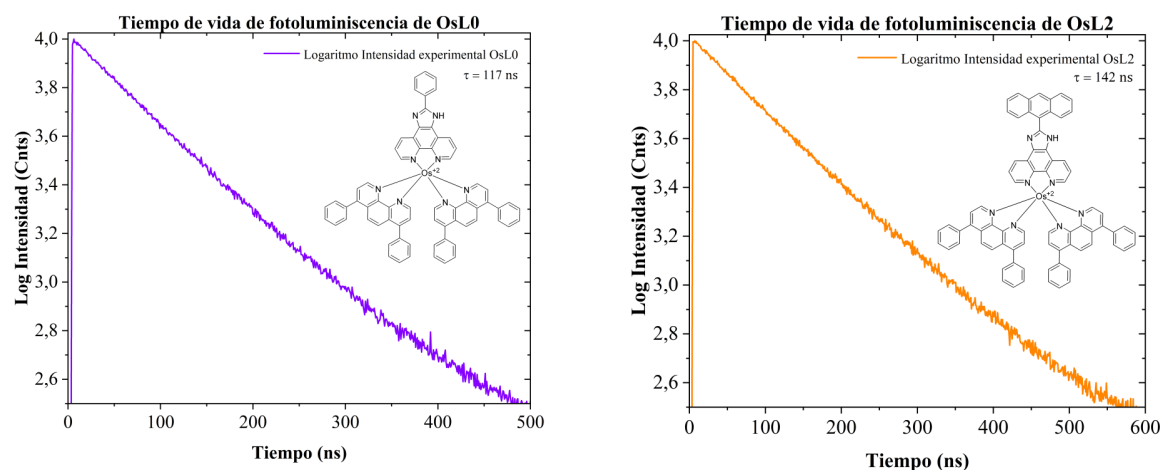


Figura 37. Tiempos de vida de fotoluminiscencia de los complejos OsL0 y OsL2 registrados en acetonitrilo. Ambos gráficos muestran la desintegración temporal de la intensidad de emisión en escala logarítmica, ajustada a un modelo monoexponencial. Para el complejo OsL0 (izquierda), el decaimiento presenta un tiempo de vida de $\tau = 117$ ns, mientras que para OsL2 (derecha) el tiempo de vida aumenta a $\tau = 142$ ns. La diferencia entre ambos valores refleja la influencia del grupo R en el entorno electrónico del complejo, afectando la estabilidad del estado excitado.

El tiempo de vida de emisión de los complejos de Os(II) se determinó en un espectrómetro de tiempo de vida. En acetonitrilo, el complejo OsL0 presentó un tiempo de vida de 117 ns, mientras que OsL2 alcanzó 142 ns.

Estos valores, son características de estados tripletes metal-ligando ($^3\text{MLCT}$) en complejos de osmio. Lo que significa que la emisión proviene de un estado excitado triplete, que tiene una vida lo suficientemente larga como para interactuar con el oxígeno molecular (O_2) y generar oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), proceso fundamental en terapia fotodinámica (PDT)^[53].

7.5 Medición de formación de oxígeno singlete

El rendimiento cuántico de la formación de oxígeno ($\text{QY } ^1\text{O}_2$) singlete se determinó mediante espectroscopía, utilizando como compuesto de referencia la perinaftenona (PNF), un compuesto aromático tricíclico empleado como estándar universal de generación de oxígeno singlete, ya que posee un rendimiento del 100% en acetonitrilo^[83].

Para la medición, la muestra se excitó a 405 nm, según el láser disponible y donde puede absorber el complejo. Tras la excitación, el fotosensibilizador transita desde su estado basal al estado excitado singlete, y luego, por un cruce entre sistemas, alcanza un estado excitado triplete. Desde este estado, el complejo transfiere energía al oxígeno en el ambiente por un mecanismo tipo II, generando oxígeno singlete que emite una fosforescencia característica a 1270 nm^[84], que es donde se detecta la señal tanto para los compuestos como para la perinaftena.

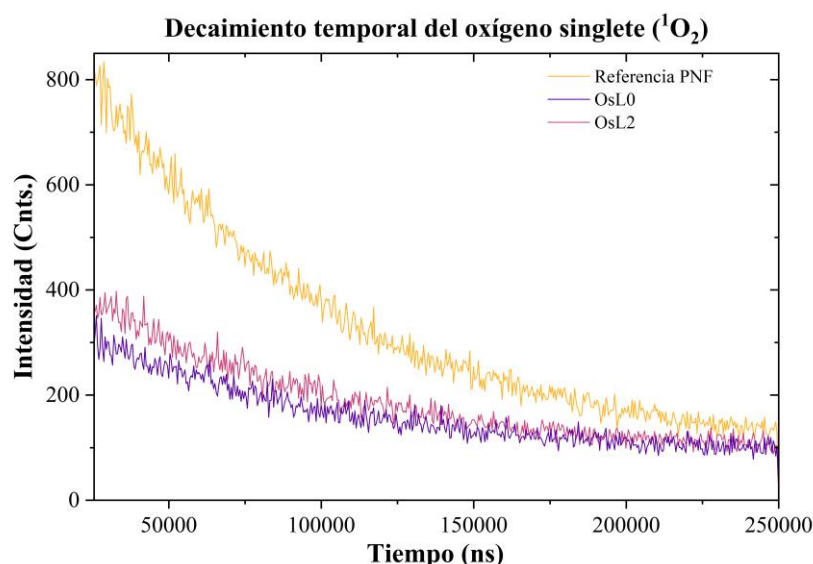


Figura 38. Decaimiento temporal de la señal de oxígeno singlete ($^1O_2$) para la referencia PNF y los complejos OsL0 y OsL2. El gráfico muestra la disminución de la intensidad de emisión característica del oxígeno singlete en función del tiempo, evidenciando un comportamiento monoexponencial para las tres muestras. La referencia PNF presenta la mayor intensidad inicial y un decaimiento más lento, mientras que los complejos OsL0 y OsL2 exhiben señales de menor intensidad y tiempos de decaimiento más cortos. Estas diferencias reflejan la distinta eficiencia de transferencia de energía triplete a oxígeno molecular entre los compuestos, indicando variaciones en su capacidad de generar oxígeno singlete.

Se obtuvieron los siguientes datos para la perinaftena:

Tabla 9. Rendimiento de formación de oxígeno singlete ($^1O_2$) de la perinaftena (PNF), utilizada como referencia estándar. Estos valores se emplean como parámetros de normalización para calcular el rendimiento de generación de oxígeno singlete de los complejos estudiados:

REFERENCIA PNF		
QY $^1O_2$	Absorbancia a 405 nm	Amplitud
1	0,11958	715,35

Se utilizó la siguiente fórmula general de método directo^{[84][85]}:

$$\phi_{O_2 \text{ muestra}} = \phi_{O_2 \text{ PNF}} \times \left(\frac{\text{Amplitud}_{\text{muestra}}}{\text{Amplitud}_{\text{PNF}}} \right) \times \left(\frac{1 - 10^{-\text{Absorbancia}_{\text{PNF}} 405 \text{ nm}}}{1 - 10^{-\text{Absorbancia}_{\text{muestra}} 405 \text{ nm}}} \right)$$

Cabe destacar que se realizaron cinco muestras para calcular un promedio de rendimiento cuántico de oxígeno singlete como se muestra en las siguientes tablas:

Tabla 10. Rendimiento de formación de oxígeno singlete ($^1O_2$) del complejo OsL0, determinado a partir de los valores de absorbancia a 405 nm, la amplitud de la señal fotogenerada y el rendimiento cuántico relativo para las muestras M1 a M5. Los rendimientos obtenidos varían entre 0,426 y 0,528, mostrando un rendimiento de generación de oxígeno singlete promedio de 46,18%:

OsL0			
Muestra	Absorbancia a 405 nm	Amplitud	QY $^1O_2$
M1	0,066	222,780	0,528
M2	0,104	299,360	0,471
M3	0,131	329,340	0,426
M4	0,146	370,110	0,437
M5	0,178	446,790	0,446

Tabla 11. Rendimiento de formación de oxígeno singlete ($^1O_2$) del complejo OsL2, determinado a partir de los valores de absorbancia a 405 nm, la amplitud de la señal fotogenerada y el rendimiento cuántico relativo para las muestras M1 a M5. Los rendimientos obtenidos varían entre 0,4 y 0,471, mostrando un rendimiento de generación de oxígeno singlete promedio de 46,22%:

OsL2			
Muestra	Absorbancia a 405 nm	Amplitud	QY $^1O_2$
M1	0,103	289,660	0,460
M2	0,129	358,280	0,471
M3	0,150	406,540	0,469
M4	0,197	510,690	0,472
M5	0,069	190,740	0,440

De esta manera, para el complejo OsL0 se tiene un rendimiento de 46,18% y para OsL2 46,22% en acetonitrilo, valores muy altos, en comparación al Photofrin que tiene un rendimiento entre 1-13% [86], y que prueban la eficacia de los nuevos complejos como posibles fotosensibilizadores para terapia fotodinámica. Además, estos valores concuerdan con lo reportado en literatura, ya que, en promedio los complejos de osmio tienen un rendimiento del 41%^[18].

7.6 Estudios de fotoestabilidad de los complejos de Osmio (II).

Se realizaron pruebas de fotoestabilidad de los complejos de osmio, comparando los resultados con un fotosensibilizador de referencia Rosa Bengala. Para cada prueba, se colocaron 3 mL de solvente, acetonitrilo o metanol, y 10 μL del compuesto en una cubeta para que queden a una concentración de 3,32 mM, sometiéndola a irradiación con luz blanca a una distancia de 10 cm de la fuente, con una intensidad final de $40 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$. Se registraron espectros de absorbancia antes de la irradiación y posteriormente a 1, 3, 5, 15 y 30 minutos.

Una disminución en la absorbancia indica degradación o consumo del compuesto por efecto de la luz; un aumento sugiere formación de nuevos productos; y la estabilidad del espectro confirma fotoestabilidad. En caso de observar bandas que suben y bajan, se interpreta como desaparición del compuesto y formación de nuevas especies.

Por un lado, se observa que en acetonitrilo (véase Figura 39), los espectros de absorción de los complejos permanecen estables durante los 30 minutos de irradiación, lo que indica una alta fotoestabilidad. En el caso del complejo OsL2, presenta una variación en su banda atribuida al grupo antraceno que se degrada bajo irradiación. Sin embargo, esta modificación corresponde a una característica propia del antraceno y no implica degradación del complejo en su conjunto.

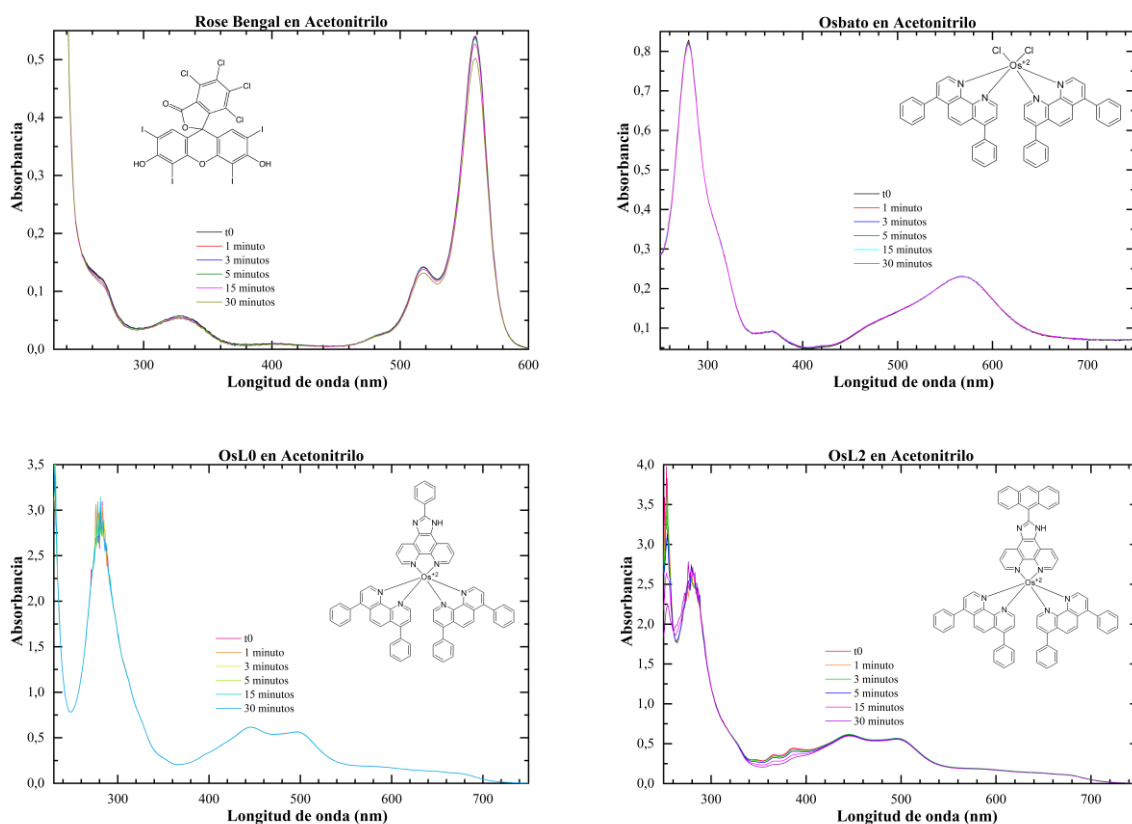


Figura 39. Ensayo de fotoestabilidad en acetonitrilo de Rose Bengal, Osbato y los complejos OsL0 y OsL2 bajo irradiación con luz blanca. Los espectros registrados entre 0 y 30 minutos muestran una

superposición casi completa de las curvas, indicando alta estabilidad fotoquímica en acetonitrilo, de todos los compuestos sin degradación apreciable durante el periodo de exposición.

Además, se observa que en metanol, los espectros de absorción de los complejos tampoco presentan variación en la totalidad del tiempo de irradiación, lo que nos indica que también son fotoestables en este solvente.

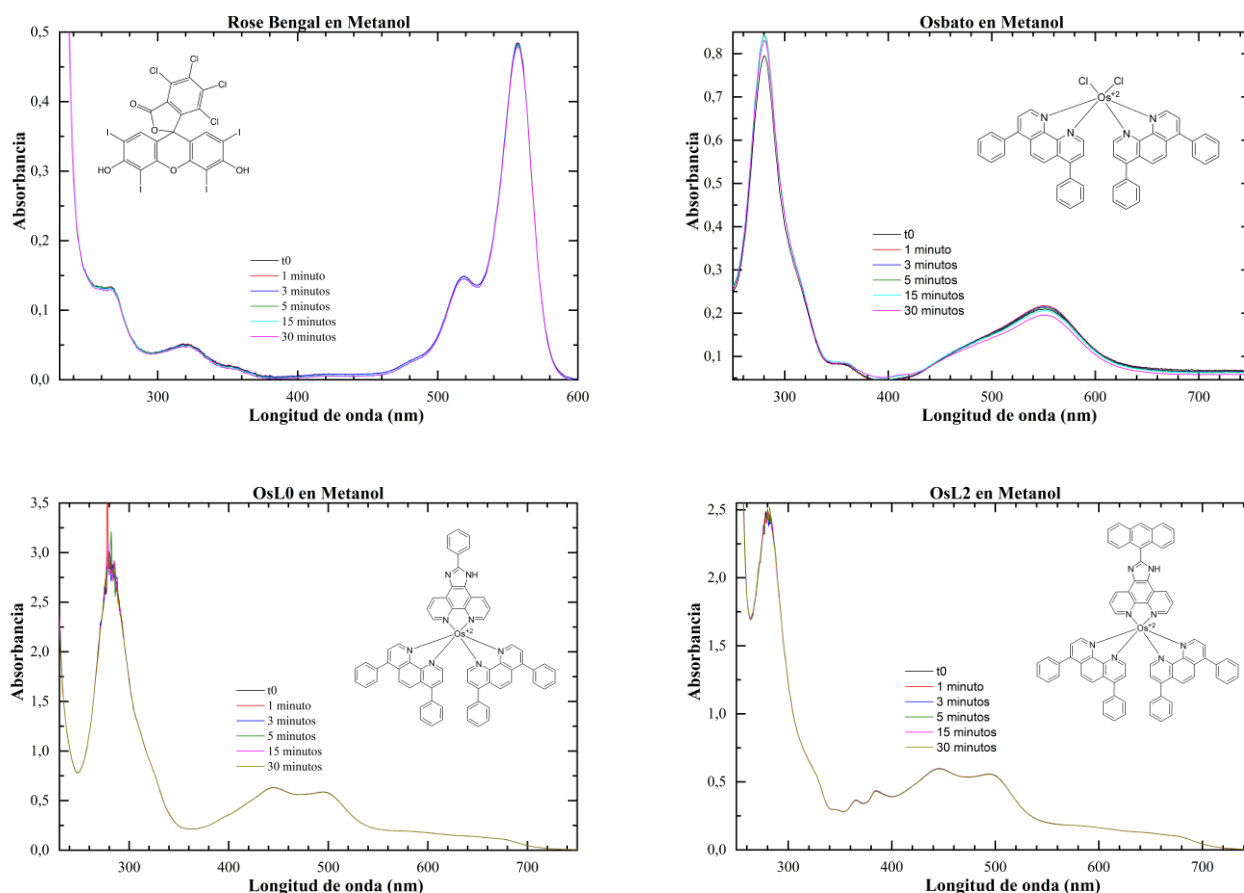


Figura 40. Ensayo de fotoestabilidad en metanol de Rose Bengal, Osbato y los complejos OsL0 y OsL2 bajo irradiación con luz blanca. Los espectros obtenidos entre 0 y 30 minutos muestran una superposición casi total de las curvas, indicando que todos los compuestos mantienen una alta estabilidad fotoquímica en metanol, sin evidenciar degradación apreciable durante el periodo de exposición.

Los resultados confirman que los complejos polipiridínicos de Os(II) sintetizados no presentan fotoblanqueo, lo que indica una alta fotoestabilidad en ambos medios. Esta propiedad es fundamental para su función como fotosensibilizadores, ya que permite realizar ensayos de terapia fotodinámica con tiempos de irradiación mínimos de 30 minutos, suficientes para que los compuestos alcancen el estado excitado triplete y generen oxígeno singlete de manera eficiente.

7.7 Estudios de fotooxidación de los complejos de Os(II)^[87].

Se hicieron estudios de fotooxidación para comprobar que los complejos de Os(II) sí son capaces de generar oxígeno singlete con los atrapadores *9,10-Dimetilantraceno* (DMA), *9,10-Difenilantraceno* (DPA), *1,5-Dihidroxi-naftaleno* (DHN) y ácido-2-furoico (FA)^[87]. En fotooxidación mediada por oxígeno singlete, los atrapadores se oxidan químicamente al reaccionar con el $^1\text{O}_2$ generado por el fotosensibilizador.

Primero, se prepararon soluciones madre disolviendo 2 mg del atrapador en 0,5 mL de solvente, acetonitrilo o metanol según la solubilidad de cada compuesto.

Segundo, en una cubeta con 3 mL de solvente (acetonitrilo o metanol) se agregaron alícuotas específicas para cada ensayo: 13 μL de DMA, 93 μL de DPA, 9 μL de DHN y 3 μL de FA, obteniendo las concentraciones indicadas en la *Tabla 12*. Finalmente, se irradió el sistema a una distancia de 10 cm de la fuente de luz. A continuación, se presentan los gráficos de absorbancia correspondientes:

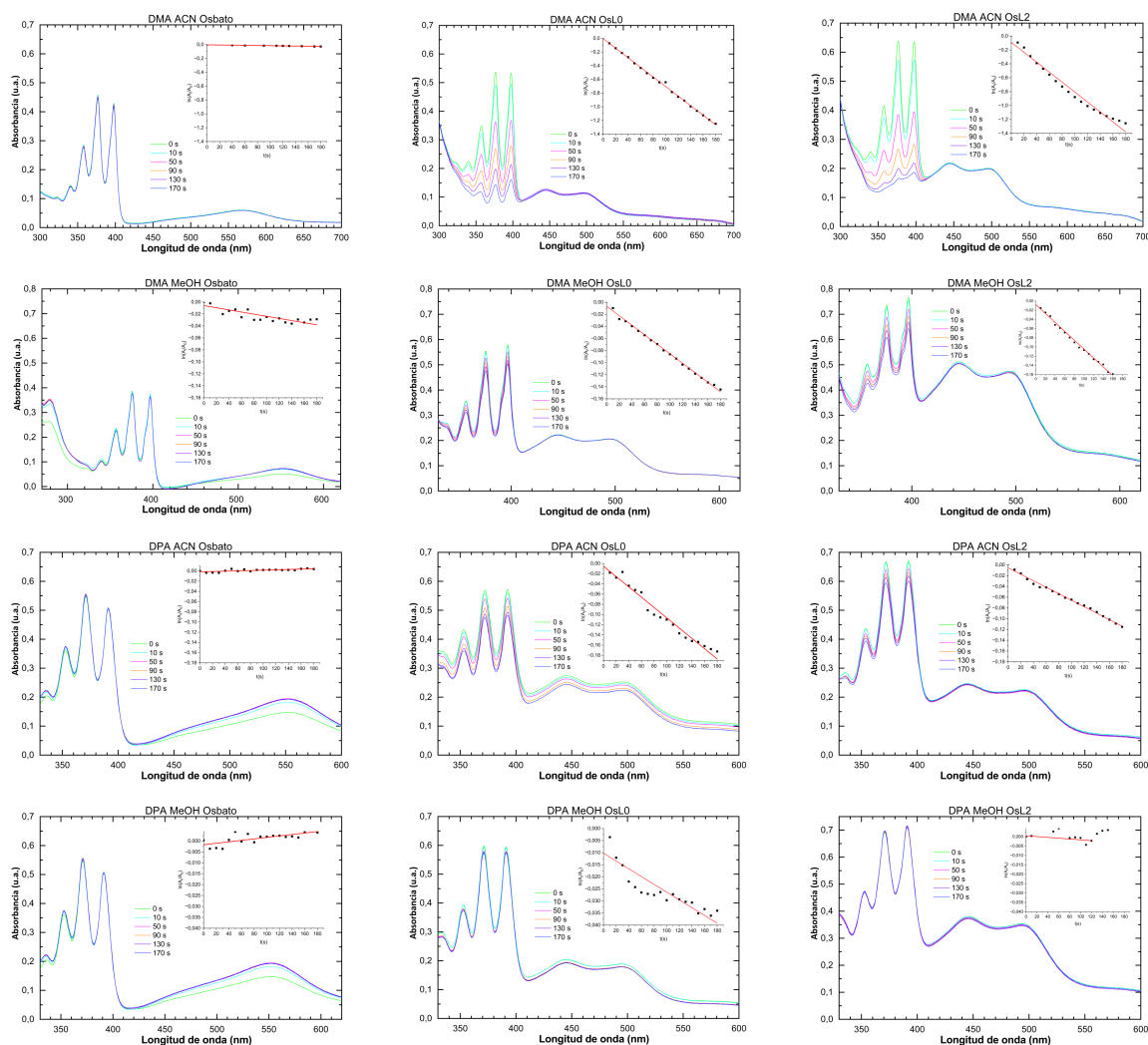


Figura 41. Gráficos de absorbancia correspondientes al proceso de fotooxidación de los atrapadores DMA y DPA en presencia de los complejos de Os(II). Cada panel muestra la evolución espectral en

función del tiempo de irradiación, evidenciando la disminución progresiva de las bandas características de cada atrapador, junto con las curvas de decaimiento incluidas en los recuadros. En conjunto, la figura confirma la generación eficiente de oxígeno singlete por los complejos, reflejada en la pérdida de absorbancia de DMA y DPA bajo irradiación.

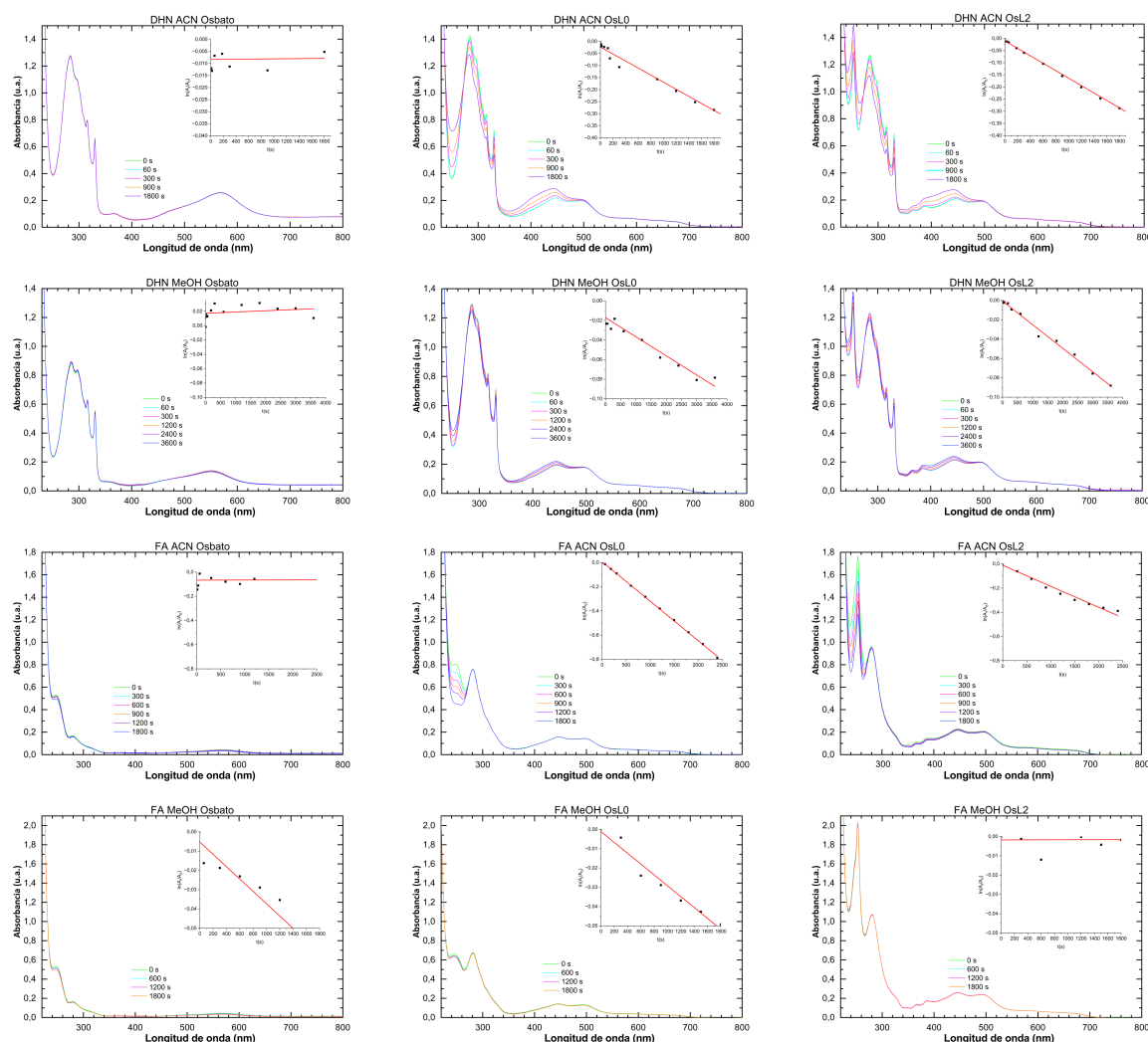


Figura 42. Gráficos de absorbancia correspondientes al proceso de fotooxidación de los atrapadores DHN y FA en presencia de los complejos de Os(II). Cada panel muestra la evolución espectral a distintos tiempos de irradiación, junto con las curvas de decaimiento incluidas en los recuadros. La disminución progresiva de las bandas características de los atrapadores evidencia su oxidación, confirmando la generación eficiente de oxígeno singlete por parte de los complejos evaluados.

Según los datos obtenidos, se realizó la *Tabla 12* donde se reportan los valores de k_{obs} , correspondientes a la constante cinética observada de la reacción de fotooxidación del atrapador en presencia del fotosensibilizador bajo irradiación.

Esta constante describe la velocidad aparente del proceso fotoquímico global observado experimentalmente, integrando procesos como la absorción de luz por el fotosensibilizador, generación de especies reactivas de oxígeno y su posterior reacción con el atrapador, entre otros.

Valores altos indican una fotoxidación rápida y eficiente, mientras que valores bajos implican un proceso lento con baja generación de especies reactivas de oxígeno o una reacción poco favorable. En aquellos casos en que no se detectó un cambio significativo, la fotoxidación fue considerada no observable.

Tabla 12. Cinética de reacción de fotoxidación obtenida para los atrapadores DMA, DPA, DHN y FA en presencia de los compuestos Osbato, OsL0 y OsL2 en distintos solventes (MeCN y MeOH). La tabla muestra las concentraciones empleadas y los valores de k_{obs} , permitiendo comparar la velocidad de fotoxidación según el tipo de atrapador, el complejo de Os(II) utilizado y el medio de disolución. En general, se observa que los valores de k_{obs} varían ampliamente entre sistemas:

Atrapador	Concentración	Compuesto	Concentración	Solvente	k_{obs} (min ⁻¹)
DMA	$8,37 \times 10^{-5} M$	Osbato	$3,32 \times 10^{-6} M$	MeCN	-
DMA	$8,37 \times 10^{-5} M$	OsL0	$3,32 \times 10^{-6} M$	MeCN	$6,9 \times 10^{-3}$
DMA	$8,37 \times 10^{-5} M$	OsL2	$3,32 \times 10^{-6} M$	MeCN	$7,15 \times 10^{-3}$
DMA	$8,37 \times 10^{-5} M$	Osbato	$3,32 \times 10^{-6} M$	MeOH	-
DMA	$8,37 \times 10^{-5} M$	OsL0	$3,32 \times 10^{-6} M$	MeOH	$7,88 \times 10^{-4}$
DMA	$8,37 \times 10^{-5} M$	OsL2	$3,32 \times 10^{-6} M$	MeOH	$9,67 \times 10^{-4}$
DPA	$3,64 \times 10^{-4} M$	Osbato	$3,23 \times 10^{-6} M$	MeCN	-
DPA	$3,64 \times 10^{-4} M$	OsL0	$3,23 \times 10^{-6} M$	MeCN	$1,01 \times 10^{-3}$
DPA	$3,64 \times 10^{-4} M$	OsL2	$3,23 \times 10^{-6} M$	MeCN	$6,02 \times 10^{-4}$
DPA	$3,64 \times 10^{-4} M$	Osbato	$3,23 \times 10^{-6} M$	MeOH	-
DPA	$3,64 \times 10^{-4} M$	OsL0	$3,23 \times 10^{-6} M$	MeOH	$1,61 \times 10^{-4}$
DPA	$3,64 \times 10^{-4} M$	OsL2	$3,23 \times 10^{-6} M$	MeOH	$1,47 \times 10^{-5}$
DHN	$7,47 \times 10^{-5} M$	Osbato	$3,32 \times 10^{-6} M$	MeCN	-
DHN	$7,47 \times 10^{-5} M$	OsL0	$3,32 \times 10^{-6} M$	MeCN	$1,46 \times 10^{-4}$
DHN	$7,47 \times 10^{-5} M$	OsL2	$3,32 \times 10^{-6} M$	MeCN	$1,53 \times 10^{-4}$
DHN	$7,47 \times 10^{-5} M$	Osbato	$3,32 \times 10^{-6} M$	MeOH	-
DHN	$7,47 \times 10^{-5} M$	OsL0	$3,32 \times 10^{-6} M$	MeOH	$1,95 \times 10^{-5}$
DHN	$7,47 \times 10^{-5} M$	OsL2	$3,32 \times 10^{-6} M$	MeOH	$2,43 \times 10^{-5}$
FA	$3,57 \times 10^{-5} M$	Osbato	$3,33 \times 10^{-6} M$	MeCN	-
FA	$3,57 \times 10^{-5} M$	OsL0	$3,33 \times 10^{-6} M$	MeCN	$3,26 \times 10^{-4}$
FA	$3,57 \times 10^{-5} M$	OsL2	$3,33 \times 10^{-6} M$	MeCN	$1,73 \times 10^{-4}$
FA	$3,57 \times 10^{-5} M$	Osbato	$3,33 \times 10^{-6} M$	MeOH	$3,19 \times 10^{-5}$
FA	$3,57 \times 10^{-5} M$	OsL0	$3,33 \times 10^{-6} M$	MeOH	$2,81 \times 10^{-5}$
FA	$3,57 \times 10^{-5} M$	OsL2	$3,33 \times 10^{-6} M$	MeOH	-

Finalmente, a partir de los perfiles cinéticos y los valores de k_{obs} obtenidos, se puede determinar que los complejos son capaces de generar oxígeno singlete, evidenciado por la disminución progresiva de la banda de absorbancia característica de los atrapadores durante la irradiación. Además, se observa una

tendencia a cinéticas de fotoxidación más rápidas en acetonitrilo (MeCN) que en metanol (MeOH), lo que evidencia el efecto del solvente sobre la eficiencia del proceso fotoquímico.

En particular, DMA se comporta como el atrapador más reactivo, y los resultados indican que OsL2 presenta constantes cinéticas mayores que OsL0. Por su parte, DPA y DHN exhiben reacciones más lentas, aunque aún más rápidas que las observadas para FA, en concordancia con su menor reactividad frente al oxígeno singlete.

En conjunto, los datos indican que OsL2 es el fotosensibilizador más eficiente, destacando la fotoxidación de DMA en acetonitrilo como la reacción más rápida, mientras que la combinación OsL0 con DHN en metanol corresponde al sistema más lento, evidenciando el marcado efecto retardante del solvente sobre la cinética de reacción.

Parte II: Estudios biológicos preliminares

1. Estudios de viabilidad celular de los complejos de Os(II).

Se realizó un ensayo de viabilidad celular bajo irradiación con luz blanca con el objetivo de determinar la concentración mínima efectiva (IC_{50}) de los compuestos, definida como la concentración necesaria para reducir al 50% la viabilidad celular. En este contexto, la viabilidad corresponde al porcentaje de células que permanecen vivas y metabólicamente activas después de ser expuestas al tratamiento

Para realizar el ensayo, se utilizó MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro) que es una sal de tetrazolio amarilla que permite evaluar si las células están metabólicamente activas (véase Figura 43). Lo anterior ocurre debido a que las enzimas mitocondriales de las células activas reducen el MTT y lo convierten en formazán, un compuesto de color púrpura.

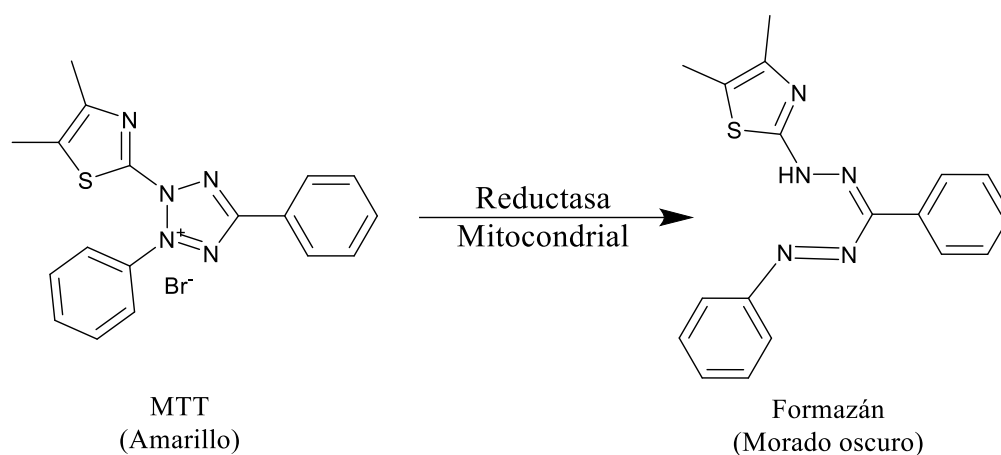


Figura 43. Esquema de la reducción del reactivo MTT, inicialmente de color amarillo, por la acción de las reductasas mitocondriales presentes en células metabólicamente activas. Este proceso convierte el MTT en formazán, un compuesto de color morado oscuro, cuya formación sirve como indicador directo de viabilidad celular y actividad mitocondrial.

El ensayo, como se mencionó, se llevó a cabo con células MCF-7, línea celular representativa de cáncer de mama e inicialmente, se evaluaron los ligandos y los complejos de Os(II) finales. Inicialmente, se siguieron los siguientes pasos:

1. Las células se cultivaron en dos placas de 96 pocillos, asignando una placa para oscuridad y otra para irradiar con dos réplicas por compuesto, según los siguientes pasos:
 - a. Las células, previamente cultivadas en placas Petri, se retiraron de la incubadora que se encontraba en condiciones estándar de 37°C y 5% CO₂.
 - b. Se eliminó el medio de cultivo (DMEM) y se realizó un lavado con PBS para remover restos de medio, considerando que el DMEM inactiva la tripsina.

- c. Se añadieron 2 mL de tripsina para favorecer el desprendimiento celular, distribuyéndola uniformemente. Posteriormente, se retiró la tripsina y las células se incubaron durante 5 min.
- d. Se agregaron 5 mL de DMEM *High Glucose*, a la placa, para resuspender las células, transfiriéndose el contenido a un tubo Falcon que contenía otros 5 mL de DMEM *High Glucose*.
- e. El conteo celular se realizó con cámara de Neubauer, mezclando 50 μL de suspensión celular con 50 μL de azul de tripano. De esta mezcla se cargaron 10 μL en la cámara para el conteo microscópico. El análisis arrojó un promedio equivalente a $1,08 \times 10^6$ células en 10 mL. Dado que se requerían 5.000 células por pocillo, se determinó que 5 μL de la suspensión celular eran suficientes para cada cavidad.
- f. En cada pocillo de ambas placas se añadieron 75 μL de DMEM y 5 μL de suspensión celular. Estas se incubaron por 24 horas bajo condiciones estándar.

En paralelo, se realiza una placa de dilución de los compuestos a utilizar en otra placa de 96 pocillos, para facilitar su traspaso a las placas con células cuando sea necesario:

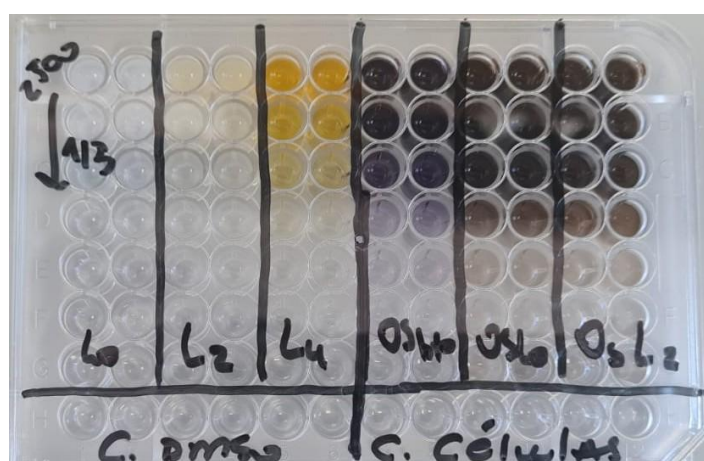


Figura 44. Placa de dilución seriada de los compuestos utilizados en el ensayo MTT. Se incluyen un control con dimetilsulfóxido (DMSO), destinado a verificar si la citotoxicidad proviene del solvente o de los compuestos evaluados, y un control de células sin tratamiento para confirmar que las condiciones del cultivo eran adecuadas para su crecimiento.

- a. En la fila A, primera fila, se agregan 262,5 μL de PBS y 37,5 μL de cada compuesto previamente solubilizado en DMSO, con una concentración de 20 mM. Esto nos dará una concentración inicial de 2500 μM .
- b. Desde la fila B a la fila G, se agregan 200 μL de PBS y 100 μL de la solución del pocillo de la fila anterior para realizar un dilución seriada, quedando con una concentración final de 3,4 μM .
- c. Esta placa se coloca en el congelador hasta el momento de utilizarla.

Tras las 24 h iniciales de incubación, se retiró el DMEM de las placas con células y se añadieron 80 μL de PBS junto con 20 μL de cada dilución del compuesto, obteniéndose concentraciones finales comprendidas entre 500 μM (primera fila) y 0,7 μM (última fila). Las células tratadas se mantuvieron 24 horas adicionales en incubación.

2. Después, una placa se irradió durante 30 minutos a 10 cm de distancia de la fuente de luz blanca con una intensidad de $40 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ y la otra placa se mantuvo en oscuridad, para luego dejar en la incubadora en oscuridad 1 hora para permitir la estabilización post-tratamiento.
3. Finalmente, se retiró el PBS y se añadieron 100 μL de DMEM *High Glucose* junto con 10 μL de MTT en cada pocillo. Las placas se incubaron durante 3 horas en condiciones estándar. Transcurrido este tiempo, se eliminó el medio y se agregaron 100 μL DMSO para solubilizar el formazán formado. La viabilidad celular se determinó mediante lectura espectrofotométrica a 450 nm.

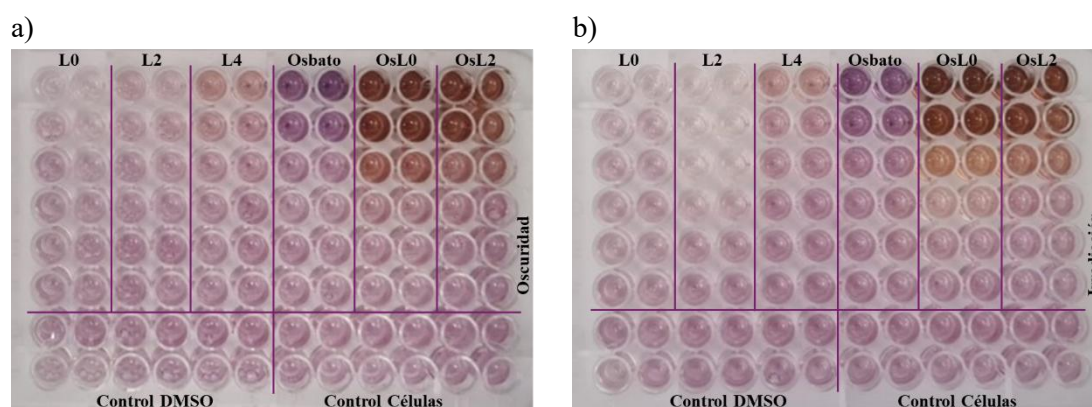


Figura 45. Primer ensayo MTT en la línea celular MCF-7. Se muestran las placas correspondientes a la acción de los ligandos y de los complejos de Os(II) luego de a) incubación en oscuridad, y b) exposición a luz blanca. Los cambios en la intensidad del color morado indican las variaciones en la viabilidad celular bajo cada condición experimental, considerando tanto el control con DMSO como el control de células sin tratamiento.

Dado que el primer ensayo MTT no presentó resultados consistente (véase Figura 45), ya que tanto la placa mantenida en oscuridad como la placa irradiada presentaron valores de viabilidad similares, sin diferencias apreciables ni a nivel cuantitativo ni visual, se decidió realizar un segundo ensayo MTT, manteniendo el protocolo base, pero con cambios en las siguientes condiciones experimentales:

- a. Se separan los ligandos de los complejos de Os(II) en placas independientes, para tener cuatro replicas por condición y poder realizar un mejor análisis de los datos.
- b. Antes de la irradiación, las placas que ya contenían células y compuestos se mantuvieron 30 minutos adicionales en incubación, con el objetivo de favorecer la interacción entre el compuesto y la célula, previo al estímulo lumínico.

- c. La placa que se irradia estuvo a 4 cm de distancia de la fuente de luz blanca por 30 minutos, bajo una intensidad de $110 J \cdot cm^{-2}$.

En este segundo ensayo pese a la presencia de impurezas, se intentó evaluar el ligando L4. Sin embargo, los resultados obtenidos fueron inconsistentes, motivo por el cual dicho ligando fue descartado del análisis posterior. En contraste, los ligandos L0 y L2 sí evidenciaron diferencias visuales claras en la intensidad del color púrpura (véase Figura 46a), sugiriendo una variación en la actividad metabólica celular asociada al tratamiento.

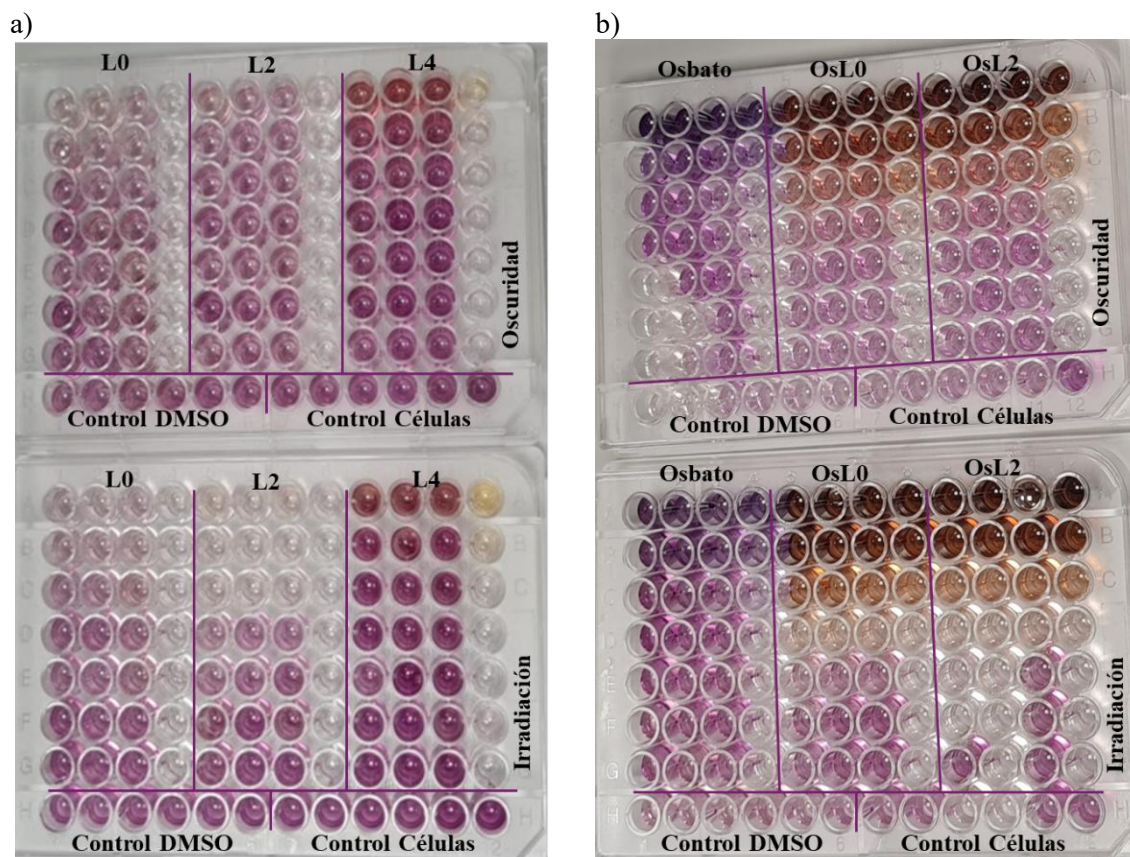


Figura 46. Segundo ensayo MTT en la línea celular MCF-7. Se presentan las placas correspondientes a la acción de a) los ligandos y de b) los complejos de Os(II) evaluados en dos condiciones experimentales: oscuridad (placas superiores), y bajo irradiación con luz blanca (placas inferiores). Las variaciones en la intensidad del color morado reflejan los cambios en la viabilidad celular tanto en presencia de los ligandos como de los complejos metálicos, considerando los controles con DMSO y los controles celulares sin tratamiento.

En relación con los datos obtenidos (véase Figura 47), se evidencia que ambos ligandos presentan fototoxicidad al comparar la viabilidad celular en condiciones de oscuridad versus irradiación. Bajo irradiación con luz blanca se observa una disminución más marcada de la viabilidad celular respecto a la condición de oscuridad para una misma concentración, destacándose efectos notorios en $18,5 \mu M$

para L0 y en 55,6 μM para L2. Sin embargo, también se detecta una reducción de la viabilidad en ausencia de luz, lo que sugiere que los ligandos poseen citotoxicidad intrínseca independiente del estímulo lumínico. Finalmente, los valores de IC_{50} obtenidos fueron 14,59 μM para L0 y 9,59 μM para L2, lo que indica que se requieren aproximadamente 15 μM del ligando L0 y 10 μM de L2 para reducir en un 50% la población de células cancerosas que permanecen activas.

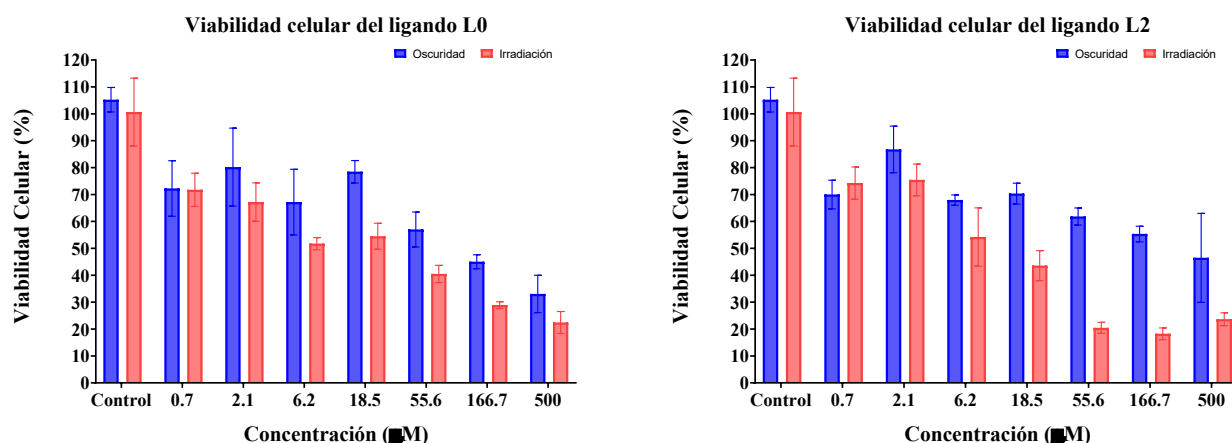


Figura 47. Comparación de la viabilidad celular obtenida para los ligandos L0 y L2 en la línea celular MCF-7 bajo dos condiciones experimentales: oscuridad e irradiación con luz blanca. Los gráficos muestran la disminución progresiva de la viabilidad a medida que aumenta la concentración de cada ligando, con una reducción más pronunciada bajo irradiación, evidenciando su fototoxicidad en contraste con la respuesta citotóxica en oscuridad.

Por su parte, la placa correspondiente a los complejos de Os(II) (véase Figura 46b) también fue descartada del análisis. Debido a que los complejos presentan alta solubilidad en DMSO, solvente utilizado para solubilizar el formazán generado en el ensayo MTT. Esta condición provocó interferencias en la lectura espectrofotométrica a 405 nm, ya que tanto el formazán como los complejos se solubilizaron simultáneamente, impidiendo una discriminación adecuada de la señal y comprometiendo la correcta cuantificación de la viabilidad celular. Adicionalmente, la ausencia de células en determinados pocillos redujo el número efectivo de réplicas disponibles, afectando la robustez estadística del ensayo y limitando la confiabilidad de los resultados obtenidos.

Considerando que la solubilidad de los complejos de Os(II) en DMSO generaba interferencias en la lectura espectrofotométrica del ensayo, y que la concentración de este solvente no debe ser más del 20% para evitar efectos citotóxicos sobre las células, y de acuerdo con lo reportado en la literatura (véase Tabla 4), se optó por disolver los compuestos en DMEM, filtrarlos para eliminar posibles agregados y, posteriormente, realizar el tercer ensayo MTT bajo estas condiciones.

En el tercer ensayo MTT, se mantuvo el protocolo base con los siguientes ajustes experimentales:

- Se separan los ligandos de los complejos de Os(II) en placas independientes, para tener cuatro replicas por condición y poder realizar un mejor análisis de los datos.
- A partir del stock inicial de concentración 20 mM en DMSO (500 μL), se seleccionan 50 μL de cada compuesto y se diluyeron en 950 μL de DMEM *High Glucose*, obteniéndose una concentración final 1 mM. Posteriormente, cada solución fue filtrada mediante filtro de 0,22 μm antes de su adición a los cultivos celulares.
- Previo a la irradiación, las placas que contenían células y compuestos se mantuvieron 24 horas en incubación, con el objetivo de favorecer la interacción entre el compuesto y la célula antes del estímulo lumínico.
- La irradiación se realizó durante 30 minutos con luz blanca, posicionando la placa a 5 cm de la fuente, bajo una intensidad de $100 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$.
- Posterior a la irradiación, las placas se incubaron durante 1 hora adicional, antes de agregar el MTT.
- Finalmente, se añadieron 10 μL de reactivo MTT por pocillo y las placas se incubaron durante 3 h antes de realizar la lectura correspondiente.

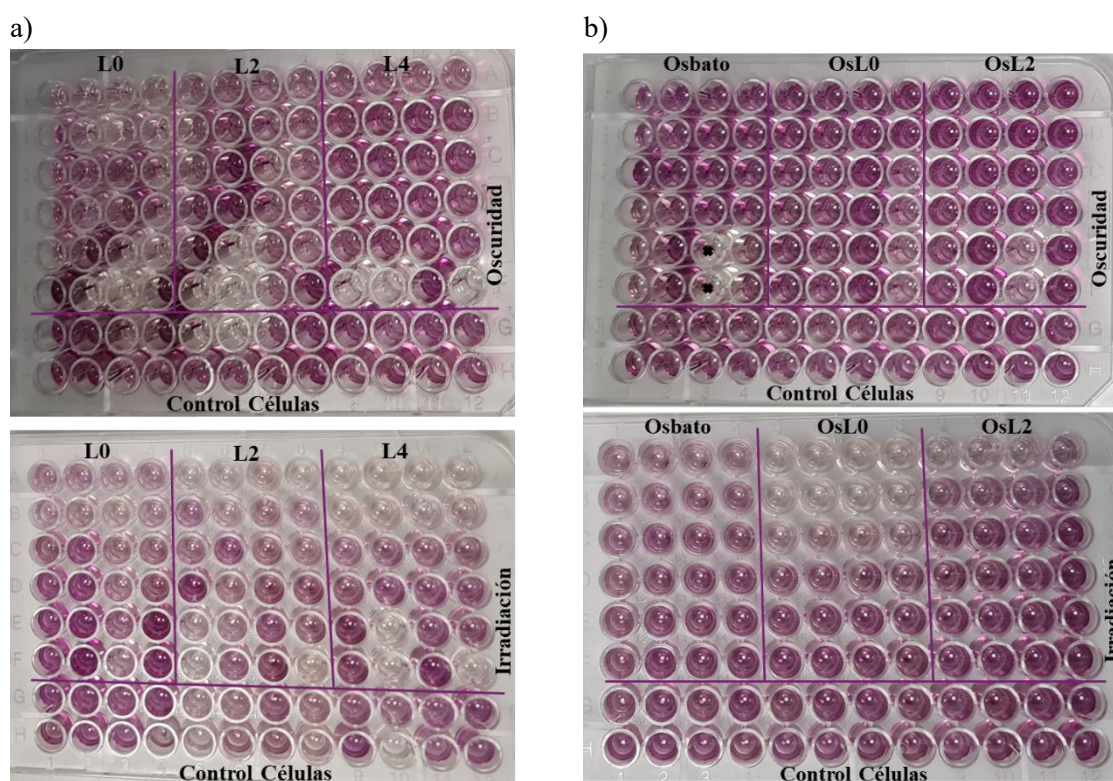


Figura 48. Tercer ensayo MTT en la línea celular MCF-7. Se muestran las placas correspondientes a la acción de a) los ligandos y de b) los complejos de Os(II), evaluados bajo dos condiciones experimentales: oscuridad (panel derecho) e irradiación con luz blanca (panel izquierdo). Las diferencias en la intensidad del color morado reflejan las variaciones en la viabilidad celular,

permitiendo comparar la citotoxicidad y fototoxicidad de cada ligando y complejo en ambas condiciones.

Respecto a los resultados obtenidos, se observa que la placa correspondiente a los ligandos bajo irradiación presentó anomalías, mostrando pocillos con una coloración morada inesperada y patrones inconsistentes, lo que indica que los datos no fueron válidos. En el caso de las placas asociadas a los complejos de Os(II), se aprecia que en oscuridad los compuestos no exhiben citotoxicidad, mientras que bajo irradiación se identifica una actividad fotodinámica marcada, siendo OsL0 el complejo más fotoactivo. A partir de estos datos se obtuvieron valores de IC_{50} de 81,9 μM para Osbato, 10,11 μM para OsL0 y 64,47 μM para OsL2; sin embargo, dichos valores no son confiables, ya que durante el proceso de filtración una fracción significativa del compuesto quedó retenida en el filtro. Aunque esta estrategia permitió mejorar parcialmente la preparación de las muestras, no fue posible determinar con precisión la concentración real de los compuestos, lo que impidió calcular de manera fidedigna los valores de IC_{50} .

Dado que el principal problema de los complejos de Os(II) era su insolubilidad en agua, condición que favorece su agregación en solución y genera turbidez que interfiere significativamente con las mediciones espectrofotométricas, se optó por emplear otras estrategias, tal como ha sido reportado para otros fotosensibilizadores y fármacos hidrofóbicos^[60].

De esta manera, se decide realizar una encapsulación de los compuestos de Os(II) en micelas para mejorar la solubilidad en agua y poder realizar el ensayo MTT, con la finalidad de obtener un valor de IC_{50} coherente. Considerando la disponibilidad de reactivos en el laboratorio, se utilizó Pluronic F-127^[61] (12.600 g/mol) que ha sido utilizado para encapsular varios fotosensibilizador como se observa en la *Tabla 12*.

Así, debido a que Pluronic F-127 mejora la solubilidad de fármacos (Véase *Tabla 12*), se decidió realizar la encapsulación de los compuestos de Os(II) siguiendo la metodología utilizada con TMPP (*meso-tetrakis(p-methoxyphenyl)porphyrin*), que es un fotosensibilizador insoluble en agua utilizado para estudiar generación de oxígeno singlete^[61]:

1. Se disuelven 1 *mg* del compuesto insoluble y 250 *mg* de Pluronic F-127 en 7 *ml* de diclorometano.
2. Se rotavapora la solución a 50°C por 20 minutos.
3. Se deja en la estufa al vacío por 24 horas a 60°C.
4. Agregar 25 mL de agua, calentar a 60°C con agitación durante 7 horas.
5. Dejar la muestra en un tubo falcón por 24 horas, para que decante lo que no quedo encapsulado.

Finalmente, las muestras se dejan en una solución acuosa a 4°C en oscuridad hasta utilizarlo directamente en el ensayo de viabilidad celular.

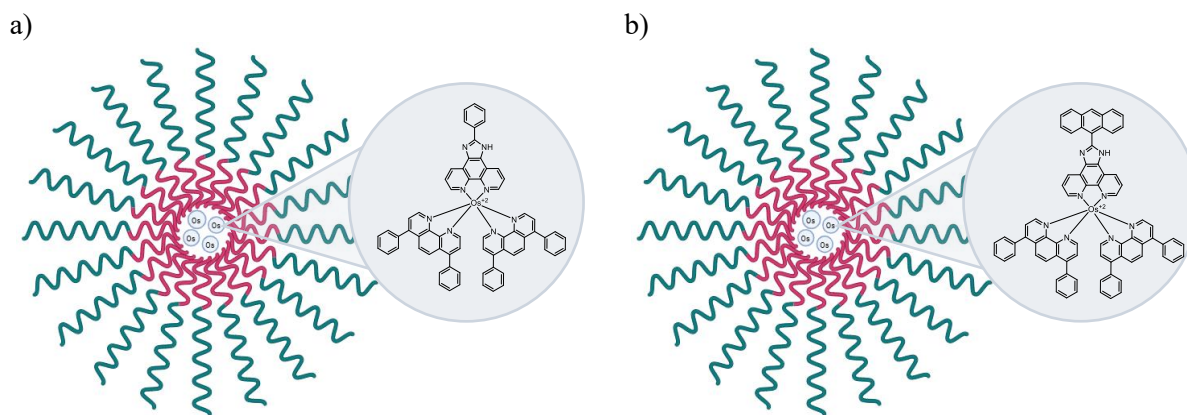


Figura 49. Representación esquemática de la encapsulación de los complejos de Os(II) dentro del núcleo hidrofóbico de las micelas formadas por Pluronic F-127. En ambos paneles (a y b), se observa cómo los bloques hidrofóbicos PPO constituyen el núcleo micelar donde se alojan los complejos metálicos, mientras que los segmentos hidrofílicos PEO forman la corona externa en contacto con el medio acuoso. La figura ilustra el mecanismo mediante el cual la micela estabiliza y solubiliza los compuestos de Os(II) en solución acuosa.

Según lo reportado en la literatura, las micelas de Pluronic F-127 alcanzan contenidos de carga entre 1,95% y 3,3% (mg de fármaco por mg de polímero)^[88], y como se utilizó 250 mg de Pluronic F-127, se puede calcular cuántos miligramos de fármaco puede encapsular, utilizando la siguiente ecuación general de porcentaje de carga:

$$\% \text{ carga} = \frac{\text{masa del fármaco}}{\text{masa del polímero}} \times 100$$

Si se despeja la masa del fármaco, obtenemos la siguiente ecuación:

$$\text{Masa del fármaco} = \frac{\% \text{ carga} \times \text{masa del polímero}}{100}$$

Luego, utilizando los datos de referencia, se obtiene lo siguiente:

$$\text{Masa mínima del fármaco} = \frac{1,95\% \times 250 \text{ mg}}{100} = 4,875 \text{ mg}$$

$$\text{Masa máxima del fármaco} = \frac{3,3\% \times 250 \text{ mg}}{100} = 8,25 \text{ mg}$$

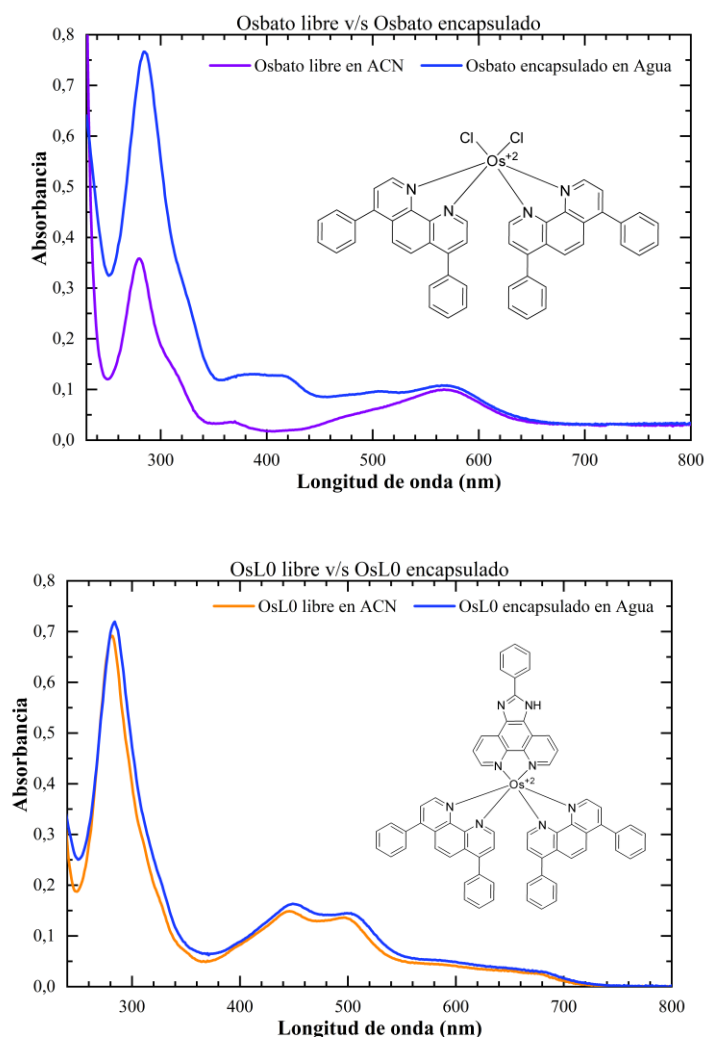
Esta información nos dice que Pluronic F-127 puede encapsular entre 4,875 mg y 8,25 mg del fotosensibilizador. Como se utilizó 1 mg de compuesto, y se encuentra debajo de la capacidad, la encapsulación es prácticamente completa. Luego, para calcular el número aproximado de moléculas encapsuladas se calculan los moles en 1 mg de cada compuesto. Finalmente, conocidos los moles, el número total de moléculas se calcula multiplicando por la constante de Avogadro:

$$\text{Número de moléculas totales} = n \times N_A = \text{moles} \times 6,022 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol}$$

Tabla 13. Cantidad de moléculas encapsuladas, considerando que la totalidad del fotosensibilizador se incorpora en la micela, dado que 250 mg de Pluronic F-127 pueden encapsular entre 4,9 y 8,3 mg del compuesto hidrofóbico y en este caso solo se empleó 1 mg del fotosensibilizador.

Compuesto Os(II)	Masa Molar	Moles en 1 mg	Moléculas encapsuladas
Osbato	925,9215 g/mol	$1,079 \times 10^{-6}$ mol	$6,50 \times 10^{17}$ moléculas
OsL0	1441,27566 g/mol	$6,94 \times 10^{-7}$ mol	$4,18 \times 10^{17}$ moléculas
OsL2	1541,38566 g/mol	$6,49 \times 10^{-7}$ mol	$3,91 \times 10^{17}$ moléculas

Aparte de hacer soluble los compuestos de Os(II), ahora se puede conocer con exactitud la concentración de estas nuevas soluciones. Antes de utilizarlos en el ensayo MTT, se compararon los espectros de absorción de los compuestos libres con los compuestos encapsulados (véase Figura 53) y utilizando la Ley de Lambert-Beer, se obtuvo una concentración aproximada de 11 μM .



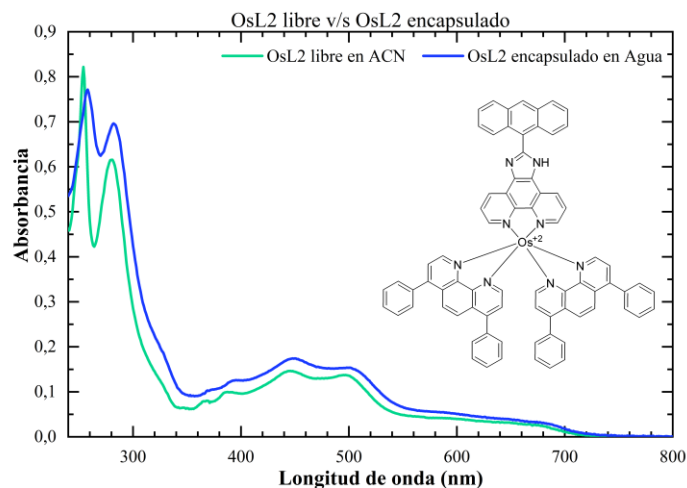


Figura 50. Comparación de los espectros de absorción de los complejos de Os(II) Osbato, OsL0 y OsL2 en dos condiciones de solubilización: como compuestos libres en acetonitrilo y encapsulados en micelas Pluronic F-127 en agua. En los tres casos, los espectros muestran las bandas características con variaciones en intensidad atribuibles al cambio de medio. La encapsulación en F-127 produce modificaciones suaves en la absorción, especialmente en la región UV–visible, indicando que la micela mantiene la integridad fotoquímica de los complejos al tiempo que permite su dispersión en un medio acuoso.

Si bien se observa una traslación en los espectros de absorción de Osbato y OsL2 tras la encapsulación en Pluronic F-127, este traslado es característico de los procesos de encapsulación micelar y se asocia a cambios en el microentorno del compuesto, además que el solvente ahora es agua^[61]. No obstante, los espectros conservan su forma original, lo que indica que la estructura electrónica y química de los complejos permanece inalterada. En consecuencia, puede concluirse que este procedimiento, empleado para mejorar su solubilidad en medios acuosos, no induce modificaciones estructurales ni confiere nuevas propiedades químicas a los compuestos.

Finalmente, se repitió el ensayo de viabilidad celular bajo las mismas condiciones previamente descritas, con la diferencia de que se realizaron tres réplicas por compuesto. La concentración inicial fue de $11\ \mu\text{M}$ en el primer pocillo, utilizando únicamente PBS como medio, donde las células claramente no iban a sobrevivir al no contar con los nutrientes necesarios, por lo que se descarta esta fila del análisis. A partir del segundo pocillo, se empleó la misma cantidad de DMEM *High Glucose*, realizando diluciones sucesivas a la mitad hasta alcanzar una concentración final de $0,086\ \mu\text{M}$, de compuesto, en el último pocillo.

Por un lado, en la placa mantenida en oscuridad (véase Figura 51) se observa que ni los compuestos evaluados ni el Pluronic F-127 presentan citotoxicidad. Osbato presenta una ligera toxicidad en oscuridad, observable por un tono morado tenue en los pocillos. Sin embargo, al ser el precursor

metálico, este comportamiento contrasta claramente con lo observado para los complejos OsL0 y OsL2, en los cuales la coordinación del metal con los ligandos elimina prácticamente su citotoxicidad. De hecho, ambos complejos muestran un color morado intenso en todas las concentraciones evaluadas, lo que evidencia que la unión del precursor con los ligandos disminuye de forma significativa su toxicidad en ausencia de luz. Finalmente, el control con células sin tratamiento confirma que las condiciones experimentales fueron adecuadas y que no se generaron efectos adversos asociados al procedimiento.

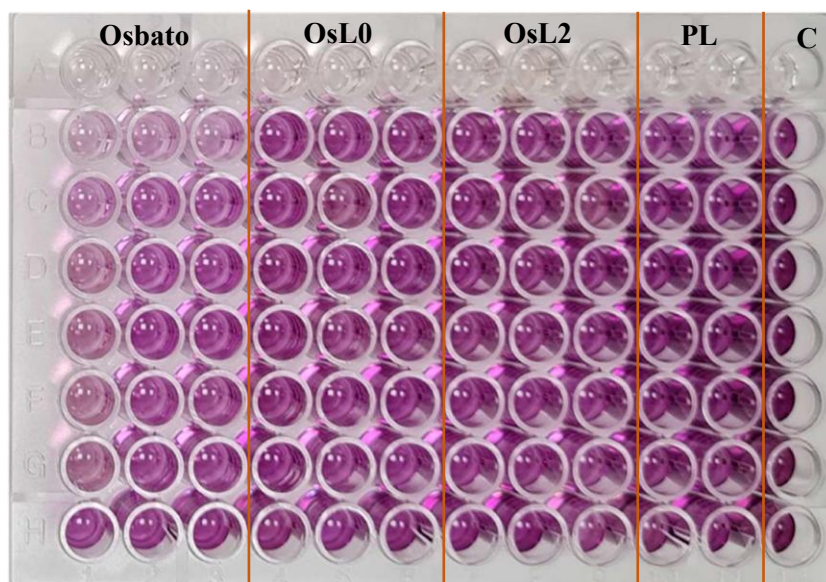


Figura 51. Placa correspondiente a los compuestos encapsulados en Pluronic F-127 evaluados en condiciones de oscuridad durante el cuarto ensayo de viabilidad celular en la línea MCF-7. Se presentan los resultados obtenidos para los complejos de Os(II), junto con los controles de Pluronic F-127 que permite verificar la ausencia de citotoxicidad del transportador y el control de células sin tratamiento, que confirma la adecuada ejecución del ensayo.

Por otro lado, en la placa sometida a irradiación (véase Figura 52), tras 30 minutos de exposición a una distancia de 5 cm de la fuente de luz blanca con una intensidad de $100 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$, se observa que la fototoxicidad de Osato disminuye progresivamente a medida que se reduce la concentración. En contraste, los complejos OsL0 y OsL2 presentan una fototoxicidad marcadamente superior a la de su precursor, independiente de la concentración empleada. Incluso en niveles muy bajos, el color morado prácticamente desaparece, lo que evidencia una significativa pérdida de viabilidad celular y, por ende, una elevada actividad anticancerosa bajo irradiación. Asimismo, el control con Pluronic F-127 permanece completamente morado, lo que confirma que este transportador no es tóxico para las células y que la actividad observada se atribuye exclusivamente a los complejos. Finalmente, el control con células sin tratamiento demuestra que las condiciones experimentales fueron adecuadas y que la reducción de la viabilidad celular se debe únicamente a la acción fotodinámica de los compuestos evaluados.

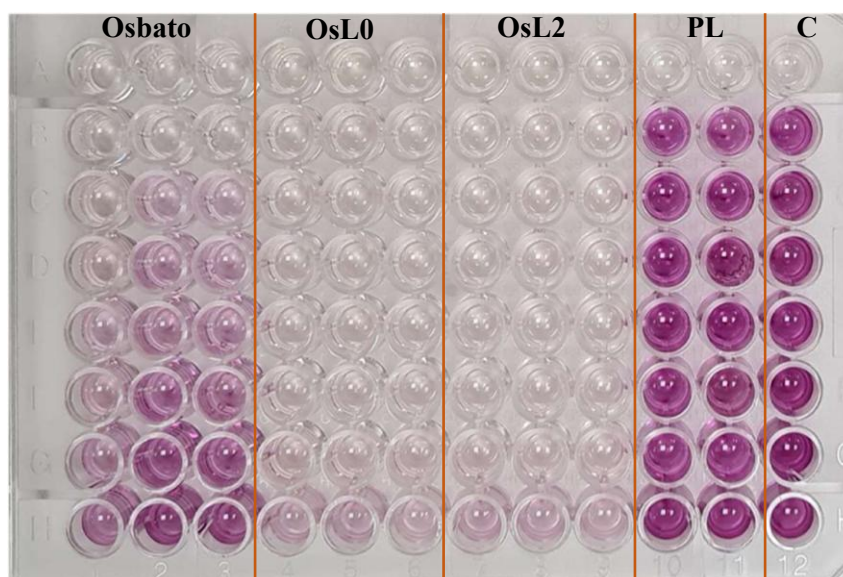
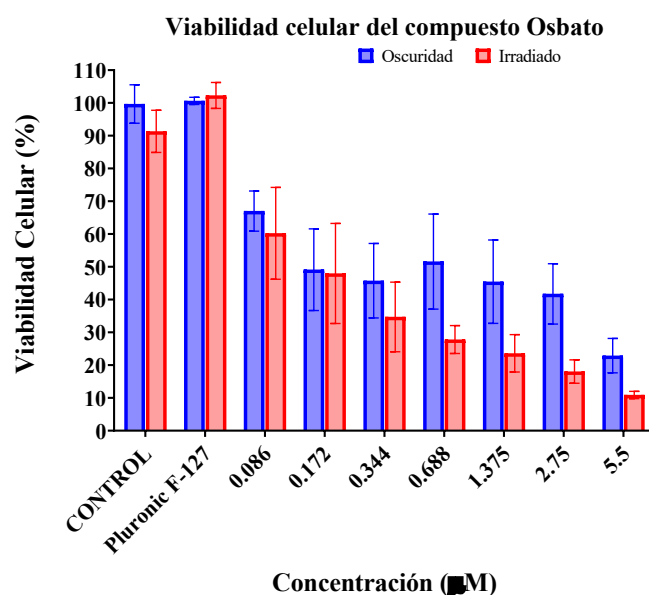


Figura 52. Placa correspondiente a los compuestos encapsulados en Pluronic F-127 tras 30 minutos de irradiación con luz blanca a 5 cm de distancia y una intensidad de $100 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$, obtenida en el cuarto ensayo de viabilidad celular en la línea MCF-7. Se comparan los complejos de Os(II) con los controles de Pluronic F-127, que no presenta fototoxicidad, y el control de células sin tratamiento, que confirma la adecuación de las condiciones experimentales.

Finalmente, se procesaron los valores obtenidos mediante el espectrofotómetro, a partir de la lectura realizada a 450 nm, y con ellos se generaron los correspondientes gráficos de viabilidad celular (véase Figura 53).



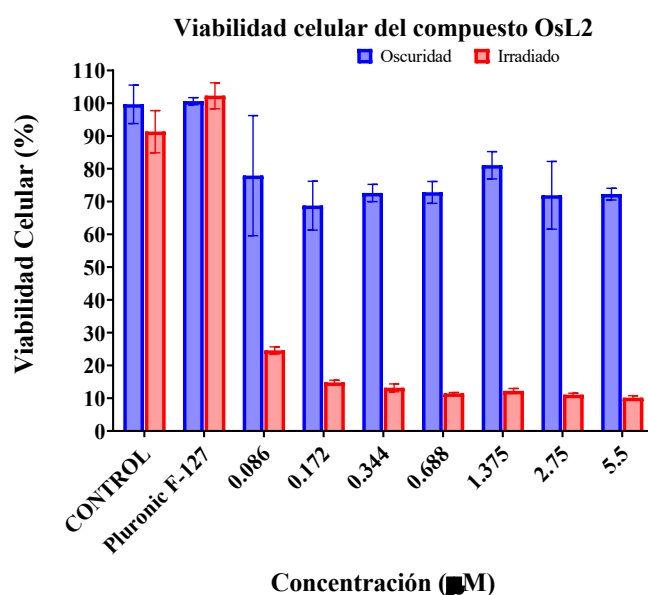
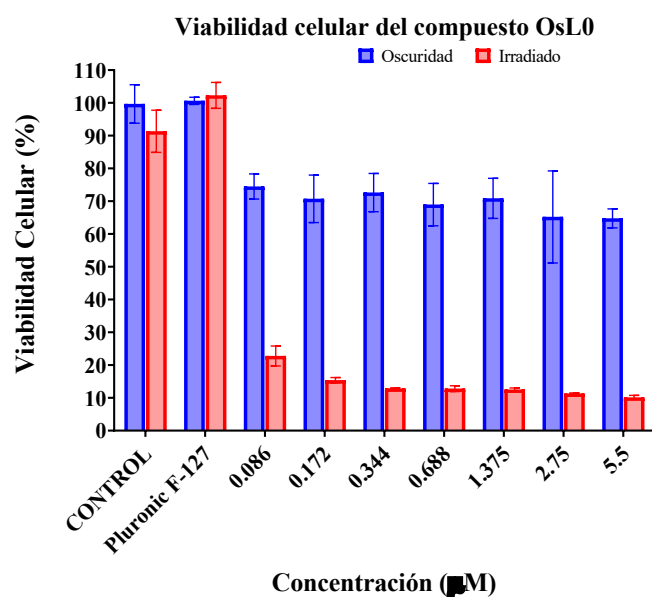


Figura 53. Viabilidad celular obtenida para los compuestos Osbato, OsL0 y OsL2 encapsulados en Pluronic F-127 en la línea celular MCF-7, evaluada mediante la lectura de absorbancia a 450 nm en condiciones de oscuridad e irradiación. Cada gráfico muestra el porcentaje de viabilidad celular en función de la concentración del compuesto, comparando los resultados obtenidos en ausencia de luz (barras azules) con aquellos registrados tras la irradiación con luz blanca (barras rojas). Se incluyen como controles el Pluronic F-127, que permite verificar la ausencia de citotoxicidad del transportador, y el control de células sin tratamiento, utilizado para confirmar la adecuada ejecución del ensayo.

En el caso de Osbato, la viabilidad celular disminuye progresivamente tanto en oscuridad como bajo irradiación a medida que aumenta la concentración, un comportamiento indeseable para un fotosensibilizador, ya que idealmente no debería mostrar citotoxicidad en ausencia de luz y sólo debería

activarse tras la exposición a una longitud de onda específica. Para este compuesto se determinó un IC_{50} de $1,494 \times 10^{-4} \text{ mM}$.

En contraste, los complejos OsL0 y OsL2 mantienen una alta viabilidad celular en oscuridad en todo el rango de concentraciones evaluado, lo que confirma que la coordinación del precursor con los ligandos reduce de manera significativa la citotoxicidad en ausencia de luz. Bajo irradiación, ambos complejos muestran una marcada disminución de la viabilidad celular, evidenciando que la coordinación también potencia la fototoxicidad y mejora la eficiencia fotodinámica. El IC_{50} de OsL0 es de $1,352 \times 10^{-7} \text{ mM}$ y el de OsL2 es de $4,186 \times 10^{-7} \text{ mM}$.

Si bien el ensayo de viabilidad celular realizado con los compuestos encapsulados muestra resultados consistentes, surge la interrogante respecto a su mecanismo de acción, particularmente en relación con el modo en que las micelas formadas ingresan a las células y la forma en que el compuesto activo se libera, en caso de que dicha liberación ocurra. La literatura indica que las micelas suelen internalizarse principalmente mediante endocitosis^{[89][90]-[91]}. En la línea celular MCF-7 la internalización de nanomicelas es mayoritariamente macropinocitosis (véase *Figura 54*), un mecanismo de endocitosis no selectiva e independiente de receptores capaz de internalizar partículas grandes como nanomicelas, caracterizada por la formación de pliegues y ondulaciones en la membrana que engloban fluido y partículas grandes^[92].

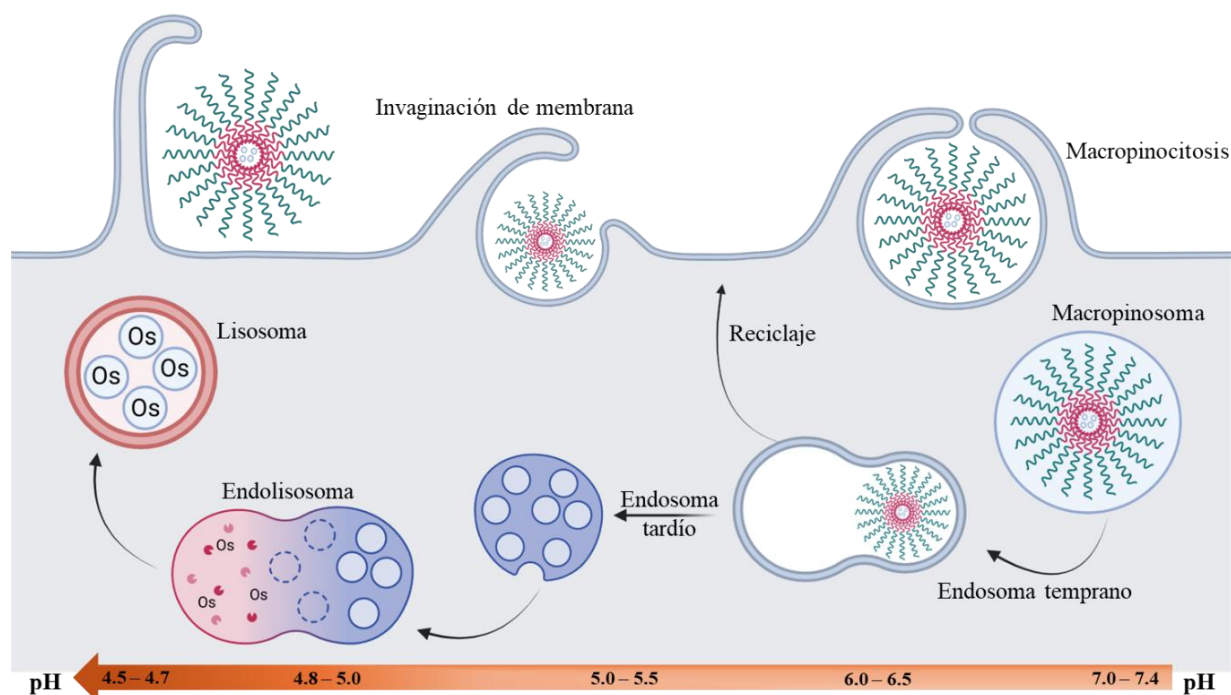


Figura 54. Representación del proceso de macropinocitosis como vía de entrada celular para micelas de Pluronic F-127 cargadas con complejos de osmio. Las micelas se incorporan mediante amplias invaginaciones de la membrana plasmática que dan origen a macropinosomas, los cuales

posteriormente se integran al sistema endosomal. Tras su formación, el macropinosoma (pH 7,0 – 7,4) progresa hacia un endosoma temprano (pH 6,0–6,5) y posteriormente hacia un endosoma tardío (pH 5,0–5,5), etapas en las que el pH decreciente favorece la desestabilización progresiva de la micela y la liberación parcial del fotosensibilizador. La ruta continúa hacia el endolisosoma (pH 4,8–5,0) y finalmente hacia el lisosoma (pH 4,5–4,7), donde ocurre la degradación final y la liberación completa del contenido. Adicionalmente, una fracción de los macropinosomas puede dirigirse hacia la vía de reciclaje, retornando su contenido a la superficie celular sin someterse a degradación lisosomal. En la parte inferior se destaca el gradiente de pH asociado a cada etapa, el cual regula la estabilidad de la micela y el proceso de liberación del compuesto encapsulado^{[93]-[94]-[95]}.

Finalmente, debido a que el metabolismo de los tejidos tumorales aumenta el consumo de glucosa y la producción de ácido láctico^[96], el microambiente tumoral presenta un pH entre 6,5-6,8, entre 0,5-1 más ácido que los tejidos sanos, que presentan un pH de 7,0 – 7,4^[97]. Esta acidez es aún mayor en compartimentos intracelulares como endosomas y lisosomas (pH entre 4,5-5,0). En este contexto, a medida que el entorno se vuelve más ácido, las micelas se degradan con mayor facilidad^[98], favoreciendo así una liberación más eficiente del fármaco encapsulado^[99].

2. Microscopía confocal preliminar^[100].

La microscopía confocal es una técnica de imagen óptica de alta resolución que optimiza la señal y elimina el ruido fuera de foco. Contiene un láser monocromático que se enfoca en un punto específico de la muestra y se desplaza sistemáticamente en los ejes X-Y-Z construyendo la imagen píxel a píxel. Además, cuenta con un diafragma confocal que bloquea la luz fuera de foco, la señal filtrada se detecta, se cuantifica y se traduce en intensidad por píxel. Finalmente, el software integra la información y genera imágenes nítidas^[101].

En este caso, la técnica de microscopía confocal fue utilizada para identificar una localización de los compuestos en las células cancerosas MCF-7, de forma preliminar. Para realizar la muestra, se prepararon en placas especiales de marca *Ibidi*, que corresponden a placas de cultivo con fondo de vidrio de #1,5, estándar para utilizar en microscopía confocal. Primero, se cultivan las células por 24 horas en la incubadora, para luego agregar los compuestos, junto con los marcadores seleccionados, y se dejan en la incubadora por otras 24 horas. Finalmente, se llevan las placas a microscopía confocal.

Por un lado, se utilizó BioTracker 405, que marca las mitocondrias de las células cancerosas al acumularse por el potencial de membrana mitocondrial. Este marcador estándar se excita a 405 nm y emite fluorescencia en el rango azul entre 420-480 nm, con un máximo de 450 nm por lo que aparece en el canal azul y en el software se le asigna un color azul. Cabe destacar que existen diferentes marcadores según lo que se necesita estudiar, por ejemplo, LysoTracker para marcar lisosomas^[102].

Respecto a los complejos, Osbato no emite señal por lo que no se utiliza en este ensayo. En cambio, OsL0 y OsL2, que presentan el mismo comportamiento, tienen un máximo de emisión en 710 nm, por lo que se utiliza un láser rojo para excitar la muestra a 633 nm (láser estándar), como los compuestos emiten una señal en el canal rojo, en el software se le asigna un color rojo.

Finalmente, ambas imágenes se superponen para analizar si el compuesto ingresa en las mitocondrias o bien se localiza en otros organelos. En este caso, como se utilizaron color azul para identificar las mitocondrias y color rojo para identificar el compuestos; las zonas que se encuentren de color violeta significan que los compuestos se encuentran dentro de las mitocondrias.

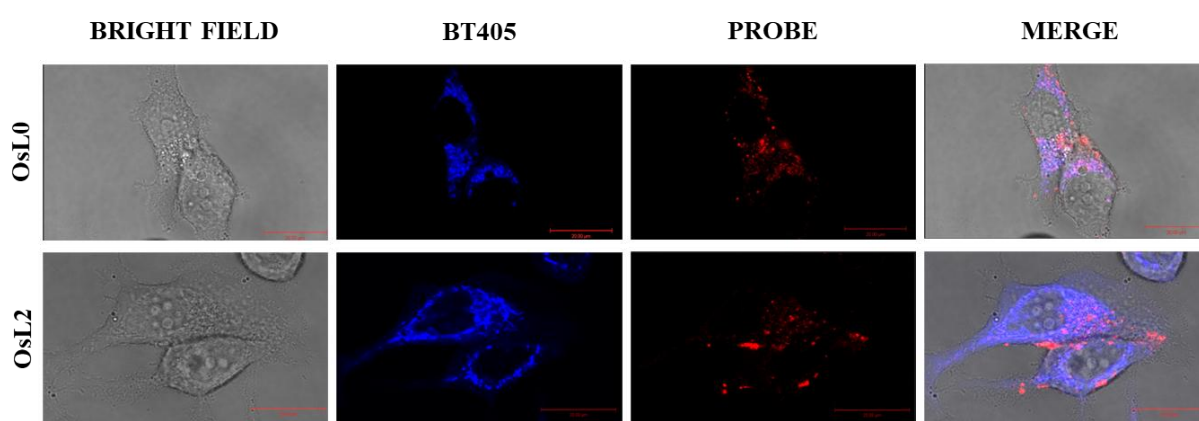


Figura 55. Imágenes de microscopía confocal de células MCF-7 incubadas con los complejos de Os(II). Primera columna: campo claro, donde se observa la morfología general de las células. Segunda columna (BT405): fluorescencia azul correspondiente al MitoTracker Blue, revelando la red mitocondrial distribuida ampliamente en el citoplasma. Tercera columna (PROBE): señal roja asociada a los complejos de Os(II), localizada en regiones citoplasmáticas. Cuarta columna (MERGE): superposición de los canales, mostrando coincidencia parcial entre ambas señales y presencia de puntos fluorescentes fuera de la red mitocondrial, así como señal periférica cercana al borde celular.

En la Figura 55, la primera columna muestra el campo claro, donde es posible distinguir la morfología general de las células y su organización citoplasmática.

En la segunda columna (“BT405”), la fluorescencia azul del marcador mitocondrial MitoTracker Blue se distribuye ampliamente en el citoplasma, adoptando un patrón reticular, lo cual se debe a que las mitocondrias no se organizan como estructuras aisladas sino que forman redes interconectadas y dinámicas que pueden ocupar gran parte del volumen celular en líneas cancerosas^[103]. En consecuencia, la señal azul sigue la morfología completa de esta red, ya que se acumula en la membrana de mitocondrias con alto potencial de membrana, características de células cancerosas como MCF-7, lo que genera una fluorescencia intensa y extendida.

En la tercera columna (“PROBE”) se observa la fluorescencia roja asociada a los complejos de Os(II), localizada en regiones del citoplasma. En la cuarta columna (“MERGE”), la superposición de los canales permite visualizar simultáneamente la morfología celular y la distribución de ambas señales. Se distinguen focos fluorescentes violeta, que indican superposición espacial entre el marcador mitocondrial y los complejos de Os(II), junto con otros puntos rojos que no colocalizan con las mitocondrias. También, se observa una señal periférica cercana al borde celular.

Así, estas imágenes permiten confirmar el correcto funcionamiento del MitoTracker, evidenciar la entrada parcial del complejo de Os(II) y detectar una colocalización inicial dentro de la red mitocondrial, además de identificar una distribución periférica de los compuestos OsL0 y OsL2.

Parte III: Formulación y evaluación económica de los fotosensibilizadores de Os(II) orientado a escalamiento del nivel de madurez de la tecnología

La escala de madurez tecnológica (TRL) es una medida para describir el estado de desarrollo de una tecnología^[104] (véase Figura 56). En el caso de los fotosensibilizadores de Os(II), el avance se encuentra en la etapa 4, correspondiente a la validación en laboratorio mediante ensayos controlados que confirman la funcionalidad en condiciones controladas^[104]. En esta fase, se enmarcan la síntesis, purificación y caracterización de los compuestos, junto con los ensayos *in vitro* preliminares realizados en la línea celular MCF-7.

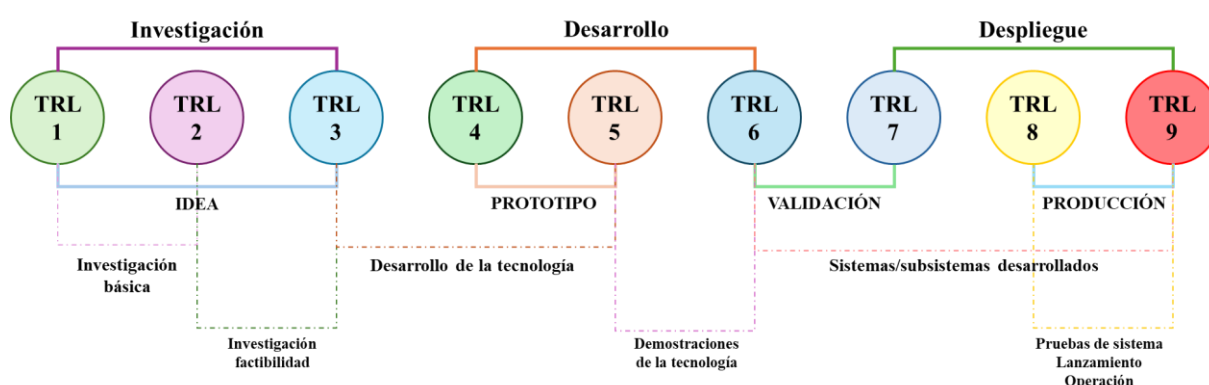


Figura 56. Representación de la escala de madurez tecnológica (TRL), organizada en tres grandes etapas: Investigación, Desarrollo y Despliegue. Cada nivel (TRL 1–9) ilustra el avance progresivo desde la generación de una idea y la investigación básica, pasando por la fase de prototipo y validación tecnológica, hasta la producción y operación final del sistema. La figura resume visualmente el proceso de evolución de una tecnología desde su concepción inicial hasta su implementación en entornos reales.. Creación propia a partir de Euro Funding^[104].

En este contexto, la proyección tecnológica contempla la comercialización de los fotosensibilizadores de Os(II) en su forma purificada y listos para su aplicación directa en ensayos *in vitro*, así como en las fases posteriores del ciclo de investigación preclínica.

Cabe destacar que el análisis cualitativo y cuantitativo abarca únicamente la etapa preliminar de la fase preclínica, limitada a la síntesis, purificación y ensayos *in vitro* iniciales de los compuestos de Os(II). Esto se debe a que, el proyecto tiene una estrategia *Business to Business* (B2B), ya que, al ser un proceso que requiere múltiples fases reguladas, altamente especializadas y de alto costo, el modelo más eficiente es avanzar hasta una etapa preclínica temprana y luego vender a laboratorios con infraestructura especializada. Estas instituciones serán responsables de ejecutar las etapas subsiguientes, que requieren cumplimiento regulatorio y capacidades clínicas avanzadas, tales como estudios en modelos murinos, ensayos clínicos en voluntarios y, eventualmente, la comercialización formal del fármaco oncológico.

1. Análisis externo

1.1 Análisis del microentorno – PESTEL

a. Político

El desarrollo de fotosensibilizadores de Os(II) para terapia fotodinámica está condicionado por regulaciones sanitarias estrictas, como el ISP en Chile, que establece restricciones en términos de tiempos, costos y requisitos técnicos necesarios para avanzar en las etapas superiores del desarrollo farmacéutico.

Sin embargo, la investigación se ve impulsada por políticas públicas que fomentan la innovación en salud. Estas incluyen el apoyo financiero de fondos concursables, como ANID, que reducen la barrera financiera en etapas tempranas de desarrollo, y la estabilidad actual del marco de propiedad intelectual, que permite asegurar el valor de la investigación mediante la obtención de patentes robustas.

b. Económico

El sector farmacéutico enfrenta un alto costo de investigación y desarrollo (I+D), con procesos preclínicos y clínicos de largo plazo con inversiones monetarias significativas. Además, la baja oferta de sales de osmio afecta directamente los costos operacionales, sin embargo, pueden ser reducidos a través de alianzas estratégicas.

De todas formas, el mercado de terapia fotodinámica muestra un crecimiento impulsado por la demanda de terapias no invasivas, lo que abre oportunidades de negocios para nuevos fotosensibilizadores.

c. Social

Actualmente, el panorama de los tratamientos oncológicos muestra una marcada preferencia por terapias no invasivas que minimizan el daño sistémico. Además, el aumento global de nuevos casos de cáncer refuerza la necesidad de nuevos tratamientos. Esto, permite la aceptación de la terapia fotodinámica en esta área, ampliando la demanda potencial de fotosensibilizadores de tercera generación.

Sin embargo, existe un miedo generalizado al uso de estos compuestos en medicina, pero, puede ser superado a través de campañas estratégicas de comunicación que demuestren la seguridad, eficacia y ventajas comparativas de estos fotosensibilizadores.

d. Tecnológico

El desarrollo de fotosensibilizadoras de Os(II) se ve favorecido por los avances en química de coordinación, que permiten diseñar moléculas estables capaces de absorber en el infrarrojo cercano y tener una mayor generación de oxígeno singlete.

Además, la innovación en sistemas de encapsulación, como micelas poliméricas o nanotransportadores, permiten superar barreras de solubilidad y distribución celular de los compuestos. Por último, el desarrollo continuo de equipos mejor implementados y con mayor precisión permite que las pruebas preclínicas sean más eficaces y rápidas.

e. Ambiental

El uso de osmio en fotosensibilizadores de tercera generación presenta impactos ambientales importantes desde la obtención de las sales de osmio hasta la síntesis y purificación de los compuestos que pueden generar residuos químicos peligrosos. Esto exige la implementación de medidas de manejo responsable, protocolos de disposición adecuada y la adopción de principios de química verde para reducir el impacto ambiental y mejorar la sostenibilidad del proceso.

f. Legal

El desarrollo de fármacos oncológicos está sujeto a un conjunto de estrictas exigencias que incrementa la complejidad regulatoria y administrativa del proceso. Estas incluyen la necesidad de llevar a cabo rigurosos ensayos clínicos, y garantizar el cumplimiento de estándares GMP (*Good Manufacturing Practices*) asegurando la calidad, seguridad y eficacia de los productos, lo que a menudo requiere certificaciones y auditorías periódicas. A este marco se suman las restricciones específicas asociadas al uso y manejo de sustancias peligrosas en química.

1.2 Análisis del macroentorno – 5 fuerzas de Porter

a. Rivalidad entre competidores actuales – Media

El mercado de la terapia fotodinámica es pequeño pero altamente especializado dominado por fotosensibilizadores con décadas de vida, como el Photofrin, fotosensibilizador de primera generación. Sin embargo, estos fármacos oncológicos aprobados sólo son efectivos para tipos de cáncer específicos y presentan desafíos como baja selectividad, baja absorción en el infrarrojo cercano y efectos secundarios prolongados.

Así, producto de estas deficiencias, pese a ser comercializados, no presentan una competencia significativa para los nuevos fotosensibilizadores de Os(II). Estos ofrecen una mejor acción antitumoral por su capacidad para absorber en el infrarrojo, lo que les confiere una ventaja competitiva superior. Incluso, se posicionan a un nivel superior al TLD-1433, ya que este último absorbe en la luz verde y no presenta una alta penetración tisular.

Por ello, aunque existe competencia, esta no representa una barrera crítica para tecnologías innovadoras con propiedades significativamente superiores.

b. Amenaza de sustitución – Alta

El área de oncología presenta diversos tratamientos como cirugía, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia, entre otros. El tipo de terapia depende del tipo y etapa del tumor; por ejemplo, los cánceres metastásicos suelen tratarse de forma sistémica con quimioterapia.

Además, como la terapia fotodinámica se encuentra en continuo desarrollo, la búsqueda de nuevos fotosensibilizadores está en auge. Por consiguiente, si los fotosensibilizadores de Os(II) no demuestran un beneficio clínico claro y diferenciado respecto a las opciones existentes, corren el riesgo de ser reemplazados fácilmente tanto por otros fotosensibilizadores emergentes, o antiguos, como por terapias

oncológicas tradicionales. En consecuencia, la amenaza de sustitución es alta y constituye un desafío relevante para el posicionamiento futuro.

c. Amenaza nuevos competidores – Baja

Al momento de ingresar a esta industria de farmacología oncológica se presentan grandes barreras de entrada, comenzando por el alto costo de inversión necesaria para llevar a cabo los ensayos preclínicos y clínicos.

A esto se suman los tiempos regulatorios prolongados y la estricta exigencia de infraestructura especializada, lo que a menudo requiere la formación de alianzas estratégicas con instituciones que ya posean el equipamiento necesario para los ensayos preclínicos.

Finalmente, la necesidad de un conocimiento altamente especializado en química de coordinación avanzada y tecnologías de irradiación eleva aún más la barrera de costo para los nuevos competidores, ya que el trabajo de laboratorio exige un alto nivel de estudio y experiencia en el área. Por ello, la amenaza de nuevos entrantes se considera baja.

d. Poder de negociación de los proveedores – Alta

La industria farmacológica, específicamente del desarrollo de fotosensibilizadores enfrenta un elevado poder de negociación por parte de los proveedores. Esto debido a que, por un lado, las sales de osmio presentan un metal con acceso limitado y altos costos de obtención, lo que provoca que el número de fabricantes sea muy reducido.

Por otro lado, la dependencia de instituciones externas para realizar ensayos preclínicos y clínicos específicos también otorga a estos proveedores de servicios especializados un mayor poder para imponer precios y plazos durante el desarrollo de los compuestos.

Así, el poder de negociación de los proveedores es alto.

e. Poder de negociación de los compradores – Alta

Como el cliente objetivo de la farmacología oncológica son entidades grandes como hospitales, clínicas y sistemas de salud tienen una elevada capacidad de negociación por su disposición a adoptar nuevos tratamientos, estrictamente condicionada a la evidencia clínica rigurosa que se les presente.

En este caso, para fotosensibilizadores de tercera generación emergentes, la carga de prueba para demostrar una eficacia antitumoral comparable, e incluso superior, a fotosensibilizadores de primera y segunda generación ya comerciales es elevada. Esto, provoca que los clientes sean inicialmente exigentes en su proceso de evaluación y potencial incorporación.

Así, el poder de negociación de los compradores es alto.

2. Análisis interno – Cadena de Valor

2.1 Actividades primarias

a. Logística de entrada

Incluye la adquisición y gestión de insumos críticos para la síntesis de los complejos de osmio y equipamiento avanzado de laboratorio para la caracterización.

Además, esta etapa requiere alianzas estratégicas con entidades externas, una coordinación estrecha con proveedores especializados y una gestión eficiente del inventario, considerando el alto costo de algunos materiales.

b. Operaciones

Considera la síntesis y purificación de los complejos de Os(II), la caracterización fotofísica y fotoquímica, y el desarrollo de formulaciones para mejorar la solubilidad y la distribución celular.

En esta parte se realizan los estudios preclínicos *in vitro* e *in vivo* que permiten validar la actividad preliminar del fotosensibilizador en un entorno de laboratorio.

Además, se elaboran documentos técnicos básicos para respaldar la transferencia tecnológica hacia instituciones especializadas.

c. Logística de salida

Consiste en preparar los compuestos purificados para su transferencia a laboratorios con capacidades avanzadas, quienes serán los responsables de realizar estudios preclínicos y clínicos posteriores. Incluye la generación de lotes piloto de laboratorio y el aseguramiento de calidad básico necesario para que el receptor pueda continuar el desarrollo.

d. Marketing y ventas

Incluye la elaboración de propuestas de valor para laboratorios e instituciones de I+D, la presentación de resultados preliminares, la construcción de redes científico-tecnológicas y la identificación de potenciales socios estratégicos para el escalamiento futuro.

e. Servicio

En esta fase temprana, el servicio consiste en entregar soporte técnico a los laboratorios asociados: protocolos de uso, recomendaciones experimentales y actualizaciones de datos.

2.2 Actividades de apoyo

a. Adquisiciones

Incluye la gestión estratégica de contratos con proveedores de insumos químicos, equipamiento especializado y servicios externos especializados. Se enfoca en negociar costos, plazos y estándares de calidad, garantizando el abastecimiento oportuno de recursos críticos para la investigación y el desarrollo en laboratorio.

b. Desarrollo de la tecnología

Abarca la investigación de nuevas rutas sintéticas, la optimización de la estructura molecular, la innovación en sistemas de entrega, la implementación de técnicas analíticas avanzadas y la mejora continua del desempeño fotodinámico del fotosensibilizador.

c. Gestión de recursos humanos

Incluye la formación del personal científico y técnico, el desarrollo de capacidades avanzadas en química de coordinación y nanotecnología, y la consolidación de un equipo competente para sostener el progreso del proyecto.

d. Infraestructura de la firma

Comprende los laboratorios e infraestructura regulatoria que sostienen el desarrollo del producto. También abarca la administración general, la planificación estratégica y la gestión financiera del proyecto.



Figura 57. Representación de la cadena de valor asociada al desarrollo de fotosensibilizadores basados en complejos de Os(II). En la parte superior se muestran las actividades de apoyo, que incluyen adquisiciones, desarrollo tecnológico, gestión de recursos humanos e infraestructura, todas ellas necesarias para respaldar el avance del proyecto. En la sección inferior se describen las actividades primarias, que abarcan desde la logística de entrada y las operaciones (síntesis, purificación y caracterización), hasta la logística de salida, el marketing y ventas, y el servicio post-comercialización. La figura resume cómo cada etapa contribuye al proceso integral de desarrollo y posicionamiento de los fotosensibilizadores.

3. FODA

3.1 Fortalezas

- Los fotosensibilizadores de Os(II) presentan absorción en el infrarrojo cercano y alto rendimiento de generación de oxígeno singlete, superando a compuestos como TLD-1433.
- El proyecto posee una alta barrera de replicación debido al nivel de especialización científica requerido.
- Las rutas sintéticas y metodologías se pueden adaptar a producción de mayor escala, mediante alianzas estratégicas con instituciones especializadas, lo que reduce los costos de desarrollo.
- Existe un marco de propiedad intelectual estable que permite, a futuro, capitalizar la investigación en patentes robustas.

3.2 Oportunidades

- Existe una demanda creciente por terapias oncológicas no invasivas.
- Los fondos concursables, como ANID, permiten reducir la barrera financiera inicial.
- El desarrollo tecnológico del área oncológica facilita el acceso a equipamiento especializado que acelera el desarrollo preclínico.
- Los fotosensibilizadores actuales presentan limitaciones clínicas relevantes, dejando espacio para nuevos complejos con mejores propiedades.

3.3 Debilidades

- Altos costos de I+D, debido a que las sales de osmio son costosas, escasas y con limitados proveedores disponibles.
- La baja solubilidad de los compuestos requiere procesos adicionales de encapsulación, lo que aumenta tanto el costo como la complejidad del desarrollo.
- Se requieren alianzas institucionales con equipamiento especializado, lo que introduce riesgo en plazos y costos.
- El proceso regulatorio es extenso y prolonga el tiempo necesario para avanzar hacia fases superiores de desarrollo.

3.4 Amenazas

- Existen múltiples terapias oncológicas sustitutas que pueden desplazar alternativas emergentes como los nuevos fotosensibilizadores.
- Los proveedores son un monopolio natural de insumos críticos, como sales de osmio, y servicios especializados, aumentando su poder de negociación.
- Hospitales y clínicas exigen evidencia clínica robusta antes de incorporar nuevas terapias, lo que complica el ingreso futuro al mercado.

- Cada país presenta regulaciones propias para validar fármacos, lo que puede retrasar el escalamiento comercial internacional.

4. Flujo de caja

4.1 CAPEX

El CAPEX hace referencia a las inversiones para adquirir, mejorar o mantener activos de largo plazo, lo que incluye gastos en activos que son necesarios para las operaciones de la empresa^[105].

En este análisis, la infraestructura base del laboratorio (campana de extracción, mesones, sistema de ventilación, rotavapor y equipamiento general) ya se encontraba instalada previo al inicio del proyecto. Por lo tanto, se considera un activo existente y no se incorpora en el CAPEX.

Consideramos material durable utilizado en la síntesis y purificación, y los activos intangibles regulatorios y comerciales, valorizados al día 3 de diciembre de 2025:

a. Activos tangibles

Tabla 14. Material durable necesario para la síntesis y purificación de los compuestos, incluyendo vidrio de laboratorio (balón de dos bocas, vasos precipitados, matraces Erlenmeyer), columnas para cromatografía y costos asociados a mano de obra especializada. La tabla presenta el valor estimado en CLP de cada ítem, junto con el subtotal correspondiente al material durable requerido para el proceso:

Ítem	Valor (CLP)
Balón de vidrio 2 bocas (2 unidades)	76.808
Vaso precipitado 250 mL (2 unidades)	5.236
Matraz Erlenmeyer (10 unidades)	34.153
Columna para cromatografía	42.345
Mano de obra especializada anual	17.169.012
Subtotal Material durable	17.322.101

b. Activos intangibles regulatorios y comerciales

Tabla 15. Activos intangibles vinculados a los requerimientos regulatorios y comerciales, que consideran el registro ante el ISP y los costos asociados al trámite de patente ante INAPI (publicación, peritaje y aceptación a registro). Se detalla el valor estimado de cada concepto y el subtotal final de los activos intangibles regulatorios:

Ítem	Valor (CLP)
Registro en el ISP	680.102
Patente INAPI (Publicación, Peritaje, Aceptación a registro)	1.024.970
Subtotal Activos intangibles regulatorios	1.705.072

Así, considerando el material de vidrio, que tiene un tiempo de vida superior a 1 año, y los activos intangibles regulatorios y comerciales, como la patente, tenemos un CAPEX de \$19.032.626 incluyendo IVA.

4.2 OPEX

El OPEX corresponde a los gastos generales de funcionamiento asociados a las operaciones cotidianas de la empresa^[105]. Esto considera los reactivos y solventes utilizados para la síntesis de los complejos, el material utilizado para la purificación de los compuestos y los servicios externos contratados en otras instituciones.

a. Síntesis de los complejos

Para calcular el OPEX de la síntesis de los complejos, se considera el valor en la industria de los solventes y reactivos, ya que sólo se venden en grandes volúmenes.

Tabla 16. Relación de los insumos utilizados en la síntesis de los complejos de Os(II), incluyendo reactivos metálicos, ligandos, agentes reductores, solventes y aditivos necesarios para el proceso. La tabla presenta el costo industrial estimado de cada componente en CLP, junto con el subtotal asociado a la síntesis completa, reflejando el gasto directo en materiales químicos:

Ítem	Valor Industria (CLP)
Hexacloroosmato de amonio (IV)	596.000
Batofenantrolina	291.000
Ditionito de sodio	16.184
Ligando L0	88.454
Ligando L2	131.229
Etilenglicol	120.000
Éter	42.840
Agua desionizada	35.800
Pluronic F-127	105.000
Subtotal síntesis	1.382.507

b. Solvente purificación de los complejos

Tabla 17. Listado de los solventes y materiales empleados en la purificación de los complejos de Os(II), tales como alumina para cromatografía y solventes orgánicos (acetonitrilo, tolueno, diclorometano). Se detalla el valor industrial correspondiente a cada ítem, además del subtotal total destinado a la etapa de purificación, mostrando el costo asociado al refinamiento de los productos sintetizados:

Ítem	Valor Industria (CLP)
Alumina	11.900
Acetonitrilo	76.058
Tolueno	65.400
Diclorometano	38.199
Subtotal purificación	191.557

c. Servicios externos

Los servicios externos se ejecutan principalmente en dos instituciones. En la Universidad Técnica Federico Santa María, se realizan los análisis de RMN, con una tarifa de 0.3 UF por RMN ¹H, 0.4 UF por RMN ¹³C y 0.3 UF por COSY por unidad analizada. En paralelo, en la Universidad Andrés Bello

se realizan los ensayos de fotoluminiscencia y generación de oxígeno singlete, con un costo aproximado de 2 UF por hora de uso instrumental.

Tabla 18. Relación de los servicios externos utilizados durante el desarrollo experimental, incluyendo análisis espectroscópicos (RMN ^1H , RMN ^{13}C y RMN 2D COSY), ensayos de fotoluminiscencia, adquisición de kits para ensayos MTT y horas de microscopía confocal. La tabla presenta tanto el costo en UF o euros como su equivalente en CLP, junto con el subtotal total asociado a los servicios contratados, reflejando los gastos necesarios para completar las etapas analíticas y biológicas del proyecto:

Ítem	Valor(UF)	Valor (CLP)
Análisis RMN ^1H (10 unidades)	3	118.930
Análisis RMN ^{13}C (2 unidades)	0,8	31.715
Análisis RMN 2D COSY (1H-1H) (2 unidades)	0,6	23.786
Ensayos fotoluminiscencia (4 horas)	8	317.149
Kit ensayo de crecimiento celular MTT	447 euros (100 ensayos)	47.925
Microscopía confocal (1 hora)	49,59 euros	53.168
Subtotal servicios	-	\$592.673

Así, considerando que los insumos para síntesis y purificación se comercializan únicamente en formatos de gran volumen, y sumando la contratación de los servicios externos, se tiene un OPEX de \$2.166.737 pesos chilenos incluyendo IVA.

4.3 Precio de venta

Para obtener el precio de venta, primero se calcula el costo unitario de los fotosensibilizadores dividido en tres ítem:

a. Síntesis de los complejos

Tabla 19. Costos unitarios asociados a la síntesis de los complejos OsL0 y OsL2, incluyendo los reactivos de partida (Hexacloroosmato, batofenantrolina, ditionito de sodio), los ligandos específicos (L0 y L2), solventes y otros insumos utilizados durante el proceso. La tabla presenta el costo por ítem en CLP para cada complejo y el subtotal final correspondiente a la etapa de síntesis:

Ítem	OsL0 (CLP)	OsL2 (CLP)
Hexacloroosmato de amonio (IV)	44.160	44.160
Batofenantrolina	87.300	87.300
Ditionito de sodio	48,552	48,552
Ligando L0	530.720	524.916
Etilenglicol	1.200	1.200
Éter	1.285	1.285
Agua desionizada	6.444	6.444
Pluronic F127	105	105
Subtotal síntesis	\$ 671.158	\$ 665.354

b. Purificación de los compuestos

Tabla 20. Costos unitarios de la purificación de los complejos OsL0 y OsL2, donde se detalla el uso de alumina como material cromatográfico y los solventes requeridos (acetonitrilo, tolueno y diclorometano). Se muestra el costo asociado a cada insumo y el subtotal final destinado a la etapa de purificación, permitiendo comparar el gasto entre ambos complejos:

Ítem	OsL0	OsL2
Alumina	2.142	2.142
Acetonitrilo	7.130	7.130
Tolueno		245.250
Diclorometano	3.820	3.820
Subtotal purificación	\$ 13.092	\$ 258.342

c. Servicios externos

Tabla 21. Costos correspondientes a los servicios externos contratados, tales como análisis espectroscópicos (RMN ¹H, RMN ¹³C y RMN 2D COSY), ensayos de fotoluminiscencia, adquisición de kits MTT y horas de microscopía confocal. La tabla presenta los valores unitarios en CLP y el subtotal total destinado a servicios especializados necesarios para completar la caracterización química y biológica de los complejos:

Ítem	UNITARIO
Análisis RMN ¹ H	23.786
Análisis RMN ¹³ C	15.857,5
Análisis RMN 2D COSY (1H-1H)	11.893
Ensayos fotoluminiscencia	158.574,5
Kit Ensayo de crecimiento celular MTT	47.925
Microscopía Confocal	53.168
Subtotal servicios	\$311.204

De esta manera, se tiene que el costo unitario para producir 1 gramo de OsL0 es de \$995.454 pesos chilenos y para OsL2 es de \$1.234.900, como tienen características similares se calcula un promedio entre los precios de \$1.115.177 pesos chilenos con IVA, además se agrega la mano de obra según el sueldo de un técnico de laboratorio mensual de \$1.430.751^[106], por lo tanto, el costo unitario final es de \$2.545.928.

Como se busca tener un beneficio del 40% sobre los costos, margen bastante positivo^[107], se tiene un precio de venta unitario de \$3.564.299 pesos chilenos.

4.4 Flujo de caja

Por lo tanto, para realizar el flujo de caja se considera un CAPEX de \$19.032.626, un OPEX de \$2.166.737, un costo unitario de \$2.545.928, un precio de venta de \$3.564.299. Además, se considera una TMAR del 18,6%, ya que se tiene una inflación anual del 6,6%^[108] y un riesgo del 12%. Finalmente, se consideran 20 años considerando la duración de la patente comercial^[109].

Los ingresos se calcularon considerando una precio de venta de \$3.564.299 que corresponde al valor de cada tratamiento, 12 unidades vendidas en el primer año, asumiendo que al principio la síntesis y purificación se demora bastante, y un crecimiento anual de demanda del 10%. Las unidades vendidas en cada año se calculan según la siguiente ecuación:

$$\text{Unidades vendidas en año } t = \text{Unidades año 1} * (1 + 0,10)^{t-1}$$

Los ingresos anuales en pesos chilenos se calcularon como indica la siguiente ecuación^[110]:

$$\text{Ingresos}_t = \text{Precio de venta} \times \text{Unidades vendidas}_t$$

Los costos variables se calcularon considerando un costo unitario de \$2.545.928. Se utiliza la siguiente ecuación^[111]:

$$\text{Costo variable en el año } t = \text{Costo variable por unidad} \times \text{Unidades vendidas}_t$$

La depreciación anual representa la pérdida de valor de los activos fijos como los equipos utilizados, se utiliza la fórmula de depreciación lineal^[112]:

$$D = \frac{C_i - V_r}{n}$$

El EBIT es una medida contable que muestra la ganancia antes de intereses e impuestos, es decir, cuánto gana el proyecto solo por sus operaciones. Se calcula según la siguiente ecuación^[113]:

$$EBIT = \text{Ingresos} - (\text{Costos variables} + \text{Costos fijos (OPEX)} + \text{Depreciación anual})$$

El impuesto a la renta se calculó aplicando una tasa del 27% sobre la utilidad antes de impuestos (EBIT), correspondiente a la tasa de Impuesto de Primera Categoría^[114].

El flujo neto representa cuánto dinero líquido gana o pierde el proyecto en un año determinado, después de considerar todos los ingresos, gastos, impuestos y ajustes contables. Se calculó según la siguiente ecuación:

$$FN_t = (EBIT_t - \text{Impuesto}_t) + \text{Depreciación}_t$$

Finalmente, el flujo acumulado es la suma progresiva de los flujos netos de caja generados por el proyecto desde el año 0 hasta el año t, es decir, muestra cuánto dinero se ha recuperado o perdido en total hasta cada año del horizonte de evaluación.

Con los resultados obtenidos en el flujo de caja (véase *Anexo - Flujo de caja*), se obtienen los siguientes indicadores de rentabilidad:

a. Valor Actual Neto (VAN)

El VAN es una herramienta financiera para evaluar la rentabilidad financiera de una inversión, Se calcula según la siguiente ecuación^[115]:

$$VAN = \sum_{t=1}^n \frac{FN_t}{(1 + TMAR)^t} - I_0$$

Donde, I_0 es la inversión inicial y FN_t es el flujo neto de caja en el año t . En este caso, se obtiene una VAN de \$53.693.060 de pesos chilenos, como es un valor positivo significa que el proyecto es rentable ya que generará beneficios^[116].

b. Tasa Interna de Retorno (TIR)

La TIR indicia la tasa de retorno anualizada que se espera que genere un proyecto o inversión^[117]. Además, como la TIR es del 50% y es superior a la TMAR, rentabilidad mínima exigida para cubrir el costo de oportunidad y riesgo, nos indica que la inversión generará beneficios por encima del umbral requerido.

c. Índice de Rentabilidad (IR)

El índice de rentabilidad es una métrica financiera que evalúa la capacidad de una empresa para generar ganancias en relación con sus activos^[118]. En este caso se obtuvo un valor de 2,8, y como es mayor a 1 indica que el proyecto es potencialmente rentable y que por cada unidad monetaria invertida se espera ganar más de una unidad.

d. Tiempo de Recuperación Inversión (Payback)

El Payback mide cuánto tiempo tarde un proyecto en recuperar la inversión inicial, en este caso, nos da un valor de 1,74 lo que indica que la inversión inicial se recupera completamente después del primer año y a partir del segundo año el proyecto generará beneficios netos.

En síntesis, el análisis realizado demuestra que los fotosensibilizadores de Os(II) cuentan con fundamentos estratégicos, científicos y tecnológicos que respaldan su viabilidad dentro del sector oncológico. Su proyección futura depende, no obstante, de una gestión proactiva de riesgos, de la consolidación de alianzas estratégicas con instituciones académicas, clínicas y regulatorias, y de la capacidad para generar evidencia robusta que valide su eficacia diferencial. Asimismo, los indicadores de rentabilidad evaluados muestran que se trata de un proyecto con un alto potencial económico, capaz de sostener su escalamiento y generar retornos atractivos en etapas posteriores de desarrollo.

Capítulo 5

Discusión síntesis, purificación y caracterización de los complejos de Os(II)

La síntesis de los complejos de Os(II) desarrollados se ajusta a lo reportado para sistemas polipiridínicos con conjugación π extendida, en los cuales la combinación de ligandos aromáticos conjugados con un centro metálico da lugar a arquitecturas electrónicas capaces de desplazar sus bandas de absorción hacia la región del infrarrojo cercano (NIR)^{[37]-[49]}. La obtención de los complejos se vio respaldada por evidencias experimentales que confirman su correcta formación y pureza, incluyendo espectros de ^1H -RMN, la formación de cristales y la observación de un único valor de factor de retención en cromatografía en capa fina.

Desde el punto de vista fotofísico, los complejos OsL0 y OsL2 presentan coeficientes de extinción similares, con bandas MLCT definidas entre 400–550 nm y colas de absorción que se prolongan hasta aproximadamente 700 nm. En la región de 600–800 nm ambos exhiben un máximo cercano a 600 nm, con valores de ϵ de $9,13 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para OsL0 y $10,48 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para OsL2. Estas magnitudes favorecen su activación dentro de la ventana terapéutica del rojo/NIR y permiten una mayor penetración tisular como confirman los trabajos de Mani *et al.* donde complejos estructuralmente similares presentan absorciones de hasta 740 nm, atribuibles tanto a la extensión de la conjugación como al efecto del osmio^[18]. Además, los coeficientes obtenidos superan ampliamente al fotosensibilizador de referencia Photofrin®, cuyo máximo en 630 nm presenta un bajo ϵ de $1.170 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ^[77]. En contraste, fotosensibilizadores clínicos basados en Ru(II) se activan principalmente con luz verde^[119], y requieren equipamiento óptico para alcanzar una mayor penetración tisular.

En acetonitrilo, los complejos de Os(II) muestran baja emisión; lejos de indicar ineficiencia, este comportamiento es característico del fuerte acoplamiento espín-órbita del osmio^[120], que favorece la mezcla singlete-triplete y la población de estados triplete ($^3\text{MLCT}$), más útiles para procesos de transferencia de energía que para emisión radiativa^[121]. En consecuencia, los rendimientos cuánticos de fotoluminiscencia (Φ_{PL}) son bajos.

Los tiempos de vida (τ) medidos son coherentes con complejos pesados de carácter MLCT y, aun así, permiten sostener una elevada transferencia de energía Tipo II. Este comportamiento se confirmó mediante la detección de $^1\text{O}_2$ a 1270 nm, evidenciando que τ modestos son suficientes para sostener fototoxicidad.

El rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete en acetonitrilo, parámetro clave para TFD, alcanzó un valor aproximado del 46% tanto para OsL0 como para OsL2. Este valor es comparable con los mejores reportes de complejos de Os(II) activados en NIR, como los estudios de Chen *et al.*, quienes describen complejos de Os(II) polipiridínicos que presentan valores entre 0,36 y 0,65 en acetonitrilo^[37], y según los de Roque *et al.* que presentan valores que entre 0,42 a 0,95^[53]. Además,

supera a Photofrin®, que exhibe un rendimiento de generación de oxígeno singlete de 0,28 al ser irradiado con una frecuencia de luz de 630 nm^[122]. Por contraste, el fotosensibilizador a base de rutenio Ru(bpy)₃Cl₂ reporta un rendimiento de generación de oxígeno singlete del 57% en acetonitrilo^[37], pero requiere activación con luz verde, lo que limita la penetración tisular.

En este sentido, los complejos de Os(II) tienen una ventaja competitiva al absorber en el rojo/NIR, permitiendo una mayor profundidad de activación en entornos biológicos. Así, estos resultados fotofísicos confirman que la conjugación π - π extendida de los ligandos y el centro metálico de Os(II) son ideales para avanzar hacia fases superiores de desarrollo tecnológico como fotosensibilizador en terapia fotodinámica.

Capítulo 6

Discusión estudios biológicos preliminares

Los estudios biológicos preliminares en MCF-7 demostraron un comportamiento fotodinámico altamente eficiente para ambos complejos de Os(II). La viabilidad celular mostró un patrón claro de selectividad dependiente de luz, con baja toxicidad en oscuridad, indicando que la acción fototóxica se activa con mayor intensidad en presencia de luz.

El resultado más notable proviene de los valores de IC₅₀ bajo irradiación con luz blanca. Por un lado, el complejo OsL0 tiene un IC₅₀ de $1,352 \times 10^{-4} \mu M$. Por otro lado, el complejo OsL2 tiene un IC₅₀ de $4,186 \times 10^{-4} \mu M$. Estos valores superan ampliamente lo reportado en la literatura para otros complejos de Os(II) activados en rojo/NIR.

Por ejemplo, Mani et al. describieron complejos de Os(II) con valores de IC₅₀ en el rango 0,51 – 1,3 μM en células A2780 de cáncer cervical bajo irradiación a 740 nm^[18]. De manera similar, Zhou et al. describieron complejos de Os(II) evaluados en células de cáncer de mama MCF-7, obteniendo un IC₅₀ promedio de 7,13 μM ^[50]. En comparación, los complejos OsL0 y OsL2 presentan valores con magnitudes menores, lo que se traduce en una potencia fototóxica superior. Esta diferencia sugiere que la arquitectura electrónica y comportamiento fotofísico de los complejos desarrollados favorecen una respuesta biológica más eficiente.

Además, cuando se contrastan estos valores con Photofrin®, las diferencias se vuelven todavía más dramáticas. Photofrin presenta IC₅₀ de aproximadamente 0,7 $\mu g/mL$ en MCF-7^[123], además, posee toxicidad basal en oscuridad debido a agregación y retención no selectiva. Al compararlos con el fotosensibilizador clínico TLD-1433, según Chamberlain et al., TLD-1433 presenta un EC₅₀ fotodinámico de 1,98 μM bajo irradiación verde (532 nm) en células de adenocarcinoma pulmonar humano (A549)^[124]. Si bien este valor es excelente en el contexto de PDT, sigue siendo varios órdenes de magnitud mayor que los valores obtenidos con OsL0/OsL2. Además, la activación en verde presenta limitaciones de penetración tisular, mientras que la activación rojo/NIR de nuestros Os(II) otorga ventajas significativas para el tratamiento de tumores profundos.

Finalmente, la combinación de colocalización mitocondrial y señal periférica observada en las imágenes de microscopía confocal permite proponer mecanismos preliminares de muerte celular. La unión con ligandos π -extendidos facilitan la acumulación en mitocondrias^[18], esto sugiere la activación de la vía de apoptosis como muerte celular, consistente con lo reportado para complejos de Os(II)^[49] que generan ROS localizados y desencadenan pérdida del potencial mitocondrial y liberación de citocromo c que activa la vía apoptótica intrínseca^[125]. Por otra parte, la señal periférica podría relacionarse con daño oxidativo de la membrana plasmática, mecanismo que en otros complejos de

osmio ha sido asociado a necrosis^[56]. Aunque estos resultados son preliminares, la distribución dual del compuesto es coherente con mecanismos mixtos de muerte celular dependientes de ROS.

De esta manera, la potencia fotodinámica registrada se explica por la alta eficiencia de formación de oxígeno singlete, un valor que iguala o supera a la mayoría de los fotosensibilizadores, pero con la ventaja de que operan en rojo/NIR. En conjunto, los valores de IC₅₀, la localización mitocondrial reticular, y la estabilidad luminosa de los complejos sitúan a OsL0 y OsL2 como fotosensibilizadores idóneos, incluso cuando se comparan con referentes clínicos como TLD-1433 o con sistemas ampliamente estudiados como Photofrin®.

Capítulo 7

Conclusión

El proyecto desarrolló nuevos fotosensibilizadores capaces de superar las limitaciones de los fotosensibilizadores actualmente utilizados en terapia fotodinámica (TFD), especialmente su escasa absorción en el infrarrojo cercano (NIR), región del espectro que permite mayor penetración tisular. Frente a esta problemática, se propuso la síntesis de complejos de Os(II) con ligandos fenantrolínicos, con el fin de evaluar su desempeño fotofísico, fotoquímico y fotobiológico como candidatos para TFD contra células de cáncer de mama, MCF-7.

Los resultados obtenidos permitieron confirmar la hipótesis planteada. Los complejos sintetizados mostraron absorción en la región visible/NIR, coherente con la presencia de ligandos aromáticos altamente conjugados y con el efecto del osmio.

Asimismo, los estudios fotofísicos y fotoquímicos demostraron que los complejos presentan fotoluminiscencia característica de Os(II), tiempos de vida compatibles con transferencia de energía Tipo II y un alto rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete.

Desde el punto de vista biológico, los ensayos en la línea celular de cáncer de mama, MCF-7, mostraron que ambos complejos poseen alta fototoxicidad y baja citotoxicidad en oscuridad, confirmando un comportamiento selectivo deseable en TFD. Los valores de IC_{50} obtenidos de $1,352 \times 10^{-4} \mu M$ para OsL0 y $4,186 \times 10^{-4} \mu M$ para OsL2, demuestran una potencia fotodinámica superior a fotosensibilizadores tradicionales. Además, la ausencia de fototoxicidad de Pluronic F-127 reforzó que la actividad fotodinámica es atribuible al complejo metálico y no a interferencias del transportador.

Desde la influencia de la aromaticidad de los ligandos, la comparación entre el precursor Osbato y los complejos OsL0 y OsL2 evidencia que la incorporación de ligandos fenantrolínicos aromáticos tiene un impacto determinante en la eficacia fotodinámica. Ambos complejos muestran un desempeño significativamente superior al precursor, confirmando el rol clave del ligando en la modulación de las propiedades fotofísicas y fotobiológicas. Sin embargo, la comparación entre OsL0 y OsL2 indica que un aumento adicional en la aromaticidad del ligando no conduce necesariamente a una mayor potencia en TFD, ya que OsL0, pese a presentar un menor número de anillos aromáticos, exhibe una eficacia superior a la de OsL2.

Desde la perspectiva de escalamiento tecnológico, el flujo de caja preliminar y los indicadores de rentabilidad obtenidos demostraron que, pese al alto costo del osmio como materia prima, el proyecto resulta financieramente viable en esta etapa de desarrollo. Estos resultados corresponden a una evaluación económica orientada estrictamente al nivel de madurez tecnológica actual (TRL), destinada

a proyectar la factibilidad del escalamiento técnico, sin constituir un análisis de mercado ni un estudio de comercialización.

En conclusión, los complejos de Os(II) desarrollados cumplen plenamente el objetivo general y cada uno de los objetivos específicos del proyecto. Su desempeño fotofísico, fotoquímico y fotobiológico, junto con una formulación viable y una evaluación económica coherente con el nivel de madurez tecnológica, respaldan su potencial como fotosensibilizadores eficientes para TFD y justifican su avance hacia etapas superiores del TRL, incluyendo estudios en modelos tridimensionales e *in vivo* para consolidar su aplicación terapéutica.

Capítulo 8

Trabajos futuros

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que los complejos de Os(II) polipiridínicos desarrollados poseen propiedades altamente prometedoras para su uso como fotosensibilizadores en terapia fotodinámica.

No obstante, avanzar hacia etapas superiores de madurez tecnológica y consolidarlos como candidatos terapéuticos requiere una serie de estudios complementarios a los aquí realizados, con el fin de ampliar, validar y fortalecer los hallazgos obtenidos. En esta línea, será necesario profundizar en su caracterización fotofísica mediante técnicas avanzadas de detección directa de oxígeno singlete a 1270 nm, así como evaluar su estabilidad química y fotoquímica en condiciones fisiológicas simuladas. Del mismo modo, se deben ampliar los estudios biológicos incorporando modelos tridimensionales como esferoides tumorales, nuevas líneas celulares, análisis detallados de mecanismos de muerte celular y estudios cuantitativos de captación, internalización y localización mediante microscopía confocal de.

Finalmente, para progresar hacia la validación preclínica, serán imprescindibles estudios *in vivo* que evalúen biodistribución, fototoxicidad específica, toxicidad sistémica, farmacocinética, penetración lumínica en tejidos y eficacia terapéutica en modelos tumorales.

Bibliografía

- [1] Parra-Soto, S.; Petermann-Rocha, F.; Martínez-Sanguinetti, M. A.; Leiva-Ordeñez, A. M.; Troncoso-Pantoja, C.; Ulloa, N.; Diaz-Martínez, X.; Celis-Morales, C.; Parra-Soto, S.; Petermann-Rocha, F.; et al. Cáncer En Chile y En El Mundo: Una Mirada Actual y Su Futuro Escenario Epidemiológico. *Rev. Med. Chil.*, 2020, 148 (10), 1489–1495. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872020001001489>.
- [2] World Health Organization. Cancer Today https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/bars-compare-populations?mode=cancer&types=1&cancers=20&key=total&populations=900&group_populations=1&sort_by=value0&sexes=0 (accessed Dec 16, 2025).
- [3] World Health Organization. Cancer Tomorrow https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?cancers=20&single_unit=100000&types=1&years=2050 (accessed Dec 16, 2025).
- [4] Bustos, M. Cáncer de mama: la principal causa de muerte oncológica en mujeres chilenas <https://uchile.cl/noticias/221421/cancer-de-mama-primera-causa-de-muerte-oncologica-en-mujeres-chilenas> (accessed Dec 9, 2025).
- [5] Reyes, S. J.; González, K. B.; Rodríguez, C.; Navarrete-Muñoz, C.; Salazar, A. P.; Villagra, A.; Caglevic, C.; Hepp, M. I.; Reyes, S. J.; González, K. B.; et al. Actualización General de Inmunoterapia En Cáncer. *Rev. Med. Chil.*, 2020, 148 (7), 970–982. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872020000700970>.
- [6] Baba, A. I.; Cătoi, C. *Comparative Oncology*; The Publishing House of the Romanian Academy: Bucharest, 2007.
- [7] Asociación española contra el cáncer. Fases y estadios del cáncer <https://www.contraelcancer.es/es/todo-sobre-cancer/que-es-cancer/fases> (accessed Dec 9, 2025).
- [8] CancerQuest. Desarrollo del cáncer <https://cancerquest.org/es/biologia-del-cancer/desarrollo-del-cancer#toc-el-desarro-aHQjYfGH> (accessed Dec 16, 2025).
- [9] Fundación Care. Qué es el cáncer <https://fundacioncare.cl/que-es-el-cancer/> (accessed Dec 16, 2025).
- [10] El-Hussein, A.; Manoto, S. L.; Ombinda-Lemboumba, S.; Alrowaili, Z. A.; Mthunzi-Kufa, P. A Review of Chemotherapy and Photodynamic Therapy for Lung Cancer Treatment. *Anticancer Agents Med Chem*, 2021, 21 (2), 149–161. <https://doi.org/10.2174/1871520620666200403144945>.

-
- [11] Weaver, J. M. J.; Patey, S. J. Systemic Anti-Cancer Therapy and Anaesthesia: A Narrative Review. *Anaesthesia*, 2025, 80, 12–24. <https://doi.org/10.1111/ANAE.16522>.
- [12] American Cancer Society. Treating Breast Cancer <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/treatment.html> (accessed Jan 19, 2026).
- [13] Pham, T. C.; Nguyen, V.-N.; Choi, Y.; Lee, S.; Yoon, J. Recent Strategies to Develop Innovative Photosensitizers for Enhanced Photodynamic Therapy. *Chem. Rev.*, 2021, 121 (21), 13454–13619. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00381>.
- [14] Algorri, J. F.; Ochoa, M.; Roldán-Varona, P.; Rodríguez-Cobo, L.; López-Higuera, J. M. Photodynamic Therapy: A Compendium of Latest Reviews. *Cancers (Basel)*, 2021, 13 (17). <https://doi.org/10.3390/cancers13174447>.
- [15] Diamond, I.; Granelli, S. G.; McDonagh, A. F.; Nielsen, S.; Wilson, C. B.; Jaenicke, R. Photodynamic Therapy of Malignant Tumours. *Lancet*, 1972, 2 (7788), 1175–1177. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(72\)92596-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(72)92596-2).
- [16] McFarland, S. A.; Mandel, A.; Dumoulin-White, R.; Gasser, G. Metal-Based Photosensitizers for Photodynamic Therapy: The Future of Multimodal Oncology? *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2020, 56, 23–27. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.10.004>.
- [17] Fortune Business Insights. Photodynamic Therapy Market Size, Share & Industry Analysis, By Product Type (Photosensitizer Drugs [Oral and Parenteral] and Photodynamic Therapy Devices [Laser and Non-Laser]), By Application (Cancer, Actinic Keratosis, Acne, Psoriasis, and Others), By End-User (Hospitals, Specialty Clinics, and Others), and Regional Forecast, 2024–2032 <https://www.fortunebusinessinsights.com/photodynamic-therapy-market-110441> (accessed Dec 16, 2025).
- [18] Mani, A.; Feng, T.; Gandioso, A.; Vinck, R.; Notaro, A.; Gourdon, L.; Burckel, P.; Saubaméa, B.; Blacque, O.; Cariou, K.; et al. Structurally Simple Osmium(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers for Photodynamic Therapy in the Near Infrared**. *Angewandte Chemie International Edition*, 2023, 62 (20), e202218347. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.202218347>.
- [19] Feng, G.; Zhang, G. Q.; Ding, D. Design of Superior Phototheranostic Agents Guided by Jablonski Diagrams. *Chem. Soc. Rev.*, 2020, 49 (22), 8179–8234. <https://doi.org/10.1039/D0CS00671H>.
- [20] Trachootham, D.; Alexandre, J.; Huang, P. Targeting Cancer Cells by ROS-Mediated Mechanisms: A Radical Therapeutic Approach? *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2009, 8 (7), 579–591. <https://doi.org/10.1038/NRD2803;KWRD>.
-

-
- [21] Moloney, J. N.; Cotter, T. G. ROS Signalling in the Biology of Cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2018, *80*, 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.023>.
- [22] 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>;PAGEGROUP:STRING:PUBLICATION.
- [23] Miller, J. Photodynamic Therapy: The Sensitization of Cancer Cells to Light. *J. Chem. Educ.*, 1999, *76* (5), 592–594. <https://doi.org/10.1021/ED076P592>.
- [24] 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.; et al. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA Cancer J. Clin.*, 2011, *61* (4), 250–281. <https://doi.org/10.3322/CAAC.20114>.
- [25] Comşa, Ş.; Cîmpean, A. M.; Raica, M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 Years of Experience in Research. *Anticancer Res.*, 2015, *35* (6), 3147–3154.
- [26] Cytion. Líneas celulares tumorales y sus aplicaciones: Impulsando la investigación del cáncer <https://www.cytion.com/es/Centro-de-conocimiento/Blog/Lineas-celulares-tumorales-y-sus-aplicaciones-en-la-ciencia/> (accessed Dec 16, 2025).
- [27] Huang, Zheng. A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy. *Technol. Cancer Res. Treat.*, 2005, *4* (3), 283–293. <https://doi.org/10.1177/153303460500400308>.
- [28] Foley, P. Clinical Efficacy of Methyl Aminolevulinate (Metvix®) Photodynamic Therapy. *Journal of Dermatological Treatment*, 2003, *14* (sup3), 15–22. <https://doi.org/10.1080/jdt.14.s3.15.22>.
- [29] Osiecka, B.; Jurczyszyn, K.; Ziółkowski, P. The Application of Levulan-Based Photodynamic Therapy with Imiquimod in the Treatment of Recurrent Basal Cell Carcinoma. *Med. Sci. Monit.*, 2012, *18* (2), PI5-9. <https://doi.org/10.12659/msm.882449>.
- [30] Friedberg, J. S.; Mick, R.; Stevenson, J.; Metz, J.; Zhu, T.; Buyske, J.; Sterman, D. H.; Pass, H. I.; Glatstein, E.; Hahn, S. M. A Phase I Study of Foscan-Mediated Photodynamic Therapy and Surgery in Patients with Mesothelioma. *Ann. Thorac. Surg.*, 2003, *75* (3), 952–959. [https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(02\)04474-0](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(02)04474-0).
- [31] Bae, S.-M.; Kim, Y.-W.; Lee, J.-M.; Namkoong, S.-E.; Han, S.-J.; Kim, J.-K.; Lee, C.-H.; Chun, H.-J.; Jin, H.-S.; Ahn, W.-S. Photodynamic Effects of Radachlorin on Cervical Cancer Cells. *Cancer Res. Treat.*, 2004, *36* (6), 389–394. <https://doi.org/10.4143/crt.2004.36.6.389>.
-

-
- [32] Miller, J. W.; Schmidt-Erfurth, U.; Sickenberg, M.; Pournaras, C. J.; Laqua, H.; Barbazetto, I.; Zografos, L.; Piguet, B.; Donati, G.; Lane, A.-M.; et al. Photodynamic Therapy With Verteporfin for Choroidal Neovascularization Caused by Age-Related Macular Degeneration: Results of a Single Treatment in a Phase 1 and 2 Study. *Archives of Ophthalmology*, 1999, *117* (9), 1161–1173. <https://doi.org/10.1001/archopht.117.9.1161>.
- [33] Turubanova, V. D.; Balalaeva, I. V.; Mishchenko, T. A.; Catanzaro, E.; Alzeibak, R.; Peskova, N. N.; Efimova, I.; Bachert, C.; Mitroshina, E. V.; Krysko, O.; et al. Immunogenic Cell Death Induced by a New Photodynamic Therapy Based on Photosens and Photodithazine. *J. Immunother. Cancer*, 2019, *7* (1), 350. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0826-3>.
- [34] Sai, D. L.; Lee, J.; Nguyen, D. L.; Kim, Y.-P. Tailoring Photosensitive ROS for Advanced Photodynamic Therapy. *Exp. Mol. Med.*, 2021, *53* (4), 495–504. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00599-7>.
- [35] Yano, S.; Hirohara, S.; Obata, M.; Hagiya, Y.; Ogura, S. ichiro; Ikeda, A.; Kataoka, H.; Tanaka, M.; Joh, T. Current States and Future Views in Photodynamic Therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 2011, *12* (1), 46–67. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2011.06.001>.
- [36] Steinke, S. J.; Kodanko, J. J.; Turro, C. Ruthenium Complexes for Photoactivated Dual Activity: Drug Delivery and Singlet Oxygen Generation. *Adv. Inorg. Chem.*, 2022, *80*, 285–320. <https://doi.org/10.1016/BS.ADIOCH.2022.05.001>.
- [37] Chen, F.; Cui, K.; Si, S.; Liu, Y.; Xue, S.; Wang, G.; Liang, X.; Zhu, C.; Chen, Q. Y. Polypyridyl Os(II) Complexes as Efficient Human Non-Small Cell Lung Cancer Photosensitizers with Enhanced Singlet Oxygen Generation via the Fused π -Ring Elongation. *Inorganica Chim. Acta*, 2025, *578*, 122537. <https://doi.org/10.1016/J.ICA.2025.122537>.
- [38] Monroe, S.; Colón, K. L.; Yin, H.; Roque, J. I. 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>.
- [39] Karges, J.; Heinemann, F.; Maschietto, F.; Patra, M.; Blacque, O.; Ciofini, I.; Spingler, B.; Gasser, G. A Ru(II) Polypyridyl Complex Bearing Aldehyde Functions as a Versatile Synthetic Precursor for Long-Wavelength Absorbing Photodynamic Therapy Photosensitizers. *Bioorg. Med. Chem.*, 2019, *27* (12), 2666–2675. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.05.011>.
-

-
- [40] Liang, C.; Xie, J.; Luo, S.; Huang, C.; Zhang, Q.; Huang, H.; Zhang, P. A Highly Potent Ruthenium(II)-Sonosensitizer and Sonocatalyst for in Vivo Sonotherapy. *Nat. Commun.*, 2021, *12* (1), 5001. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25303-1>.
- [41] Szymaszek, P.; Tyszka-Czochara, M.; Ortyl, J. Iridium(III) Complexes as Novel Theranostic Small Molecules for Medical Diagnostics, Precise Imaging at a Single Cell Level and Targeted Anticancer Therapy. *Eur. J. Med. Chem.*, 2024, *276*, 116648. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116648>.
- [42] Lv, Z.; Zou, L.; Wei, H.; Liu, S.; Huang, W.; Zhao, Q. Phosphorescent Starburst Pt(II) Porphyrins as Bifunctional Therapeutic Agents for Tumor Hypoxia Imaging and Photodynamic Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2018, *10* (23), 19523–19533. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b05944>.
- [43] Álvarez, D.; Menéndez, M. I.; López, R. Computational Design of Rhenium(I) Carbonyl Complexes for Anticancer Photodynamic Therapy. *Inorg. Chem.*, 2022, *61* (1), 439–455. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.1c03130>.
- [44] Feng, N.; Peng, Z.; Zhang, X.; Lin, Y.; Hu, L.; Zheng, L.; Tang, B. Z.; Zhang, J. Strategically Engineered Au(I) Complexes for Orchestrated Tumor Eradication via Chemo-Phototherapy and Induced Immunogenic Cell Death. *Nat. Commun.*, 2024, *15* (1), 8187. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-52458-4>.
- [45] Roguin, L. P.; Chiarante, N.; García Vior, M. C.; Marino, J. Zinc(II) Phthalocyanines as Photosensitizers for Antitumor Photodynamic Therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2019, *114*, 105575. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.105575>.
- [46] Azzouzi, A.-R.; Vincendeau, S.; Barret, E.; Cicco, A.; Kleinclaus, F.; van der Poel, H. G.; Stief, C. G.; Rassweiler, J.; Salomon, G.; Solsona, E.; et al. Padeliporfin Vascular-Targeted Photodynamic Therapy versus Active Surveillance in Men with Low-Risk Prostate Cancer (CLIN1001 PCM301): An Open-Label, Phase 3, Randomised Controlled Trial. *Lancet Oncol.*, 2016, *18* (2), 181–191. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30661-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30661-1).
- [47] Kaspler, P.; Mandel, A.; Dumoulin-White, R.; Roufaiel, M. Anticancer Photodynamic Therapy Using Ruthenium(II) and Os(II)-Based Complexes as Photosensitizers. In *Tumor Progression and Metastasis*; Lasfar, A., Cohen-Solal, K., Eds.; IntechOpen: Rijeka, 2020; p Ch. 10. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88519>.
- [48] Food and Drug Administration. Step 3: Clinical Research <https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-3-clinical-research> (accessed Dec 7, 2025).
-

-
- [49] Zhang, Y.; Mesdom, P.; Izquierdo-García, E.; António, J.; Saubamea, B.; Seguin, J.; Moinard, M.; Arnoux, P.; Frochet, C.; Cariou, K.; et al. A Near-Infrared-Absorbing Osmium(II) Complex as a Photosensitizer for Photodynamic Therapy Inducing Immunogenic Cell Death. September 19, 2024. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2024-6dnl2>.
- [50] Zhou, Z.; Li, S.; Ding, X.; Zhang, K.; Zhou, J.; Zhou, X. Aggregation-Induced Photosensitization of Long-Chain-Substituted Osmium Complexes for Lysosomes Targeting Photodynamic Therapy. *Cite This: ACS Appl. Bio Mater.*, 2025, 8, 3472. <https://doi.org/10.1021/acsabm.5c00224>.
- [51] Chen, X.-X.; Li, Z.-Y.; Shen, Q.-H.; Peng, K.; Wang, P.; Yu, L.-B.; Han, Y.-Y.; Tan, C.-P. Photodynamic-Photothermal Switching in Osmium-Ferritin Nanoplatfrom Activates Near Infrared-Driven Tumor Immunity Reprogramming. *ACS Nano*, 2025, 19 (29), 26953–26967. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5c08980>.
- [52] Gul, A.; Ahmad, M.; Ali, A.; Boateng, D.; Yang, L.; Kang, Y.; Liao, W. Near-Infrared Light-Activated Osmium-Complex/UiO-67-Bpy Composite for Enhanced Antibacterial Activity and Wound Healing. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2025, 255. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2025.114935>.
- [53] Roque, J. A.; Barrett, P. C.; Cole, H. D.; Lifshits, L. M.; Shi, G.; Monroe, S.; Von Dohlen, D.; Kim, S.; Russo, N.; Deep, G.; et al. Breaking the Barrier: An Osmium Photosensitizer with Unprecedented Hypoxic Phototoxicity for Real World Photodynamic Therapy. *Chem. Sci.*, 2020, 11 (36), 9784–9806. <https://doi.org/10.1039/d0sc03008b>.
- [54] Ge, C.; Huang, H.; Wang, Y.; Zhao, H.; Zhang, P.; Zhang, Q. Near-Infrared Luminescent Osmium(II) Complexes with an Intrinsic RNA-Targeting Capability for Nucleolus Imaging in Living Cells. *ACS Appl. Bio Mater.*, 2018, 1 (5), 1587–1593. <https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00455>.
- [55] Sun, Y.; Joyce, L. E.; Dickson, N. M.; Turro, C. DNA Photocleavage by an Osmium(II) Complex in the PDT Window. *Chemical Communications*, 2010, 46 (36), 6759–6761. <https://doi.org/10.1039/c0cc02571b>.
- [56] Lu, N.; Deng, Z.; Gao, J.; Liang, C.; Xia, H.; Zhang, P. An Osmium-Peroxo Complex for Photoactive Therapy of Hypoxic Tumors. *Nature Communications* 2022 13:1, 2022, 13 (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29969-z>.
- [57] Lazic, S.; Kaspler, P.; Shi, G.; Monroe, S.; Sainuddin, T.; Forward, S.; Kasimova, K.; Hennigar, R.; Mandel, A.; McFarland, S.; et al. Novel Osmium-Based Coordination Complexes as
-

-
- Photosensitizers for Panchromatic Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.*, 2017, 93 (5), 1248–1258. <https://doi.org/10.1111/PHP.12767>;PAGEGROUP:STRING:PUBLICATION.
- [58] Roque, J. A. I. I.; Barrett, P. C.; Cole, H. D.; Lifshits, L. M.; Bradner, E.; Shi, G.; von Dohlen, D.; Kim, S.; Russo, N.; Deep, G.; et al. Os(II) Oligothieryl Complexes as a Hypoxia-Active Photosensitizer Class for Photodynamic Therapy. *Inorg. Chem.*, 2020, 59 (22), 16341–16360. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c02137>.
- [59] Bhat, S. S.; Kumbhar, A. A.; Heptullah, H.; Khan, A. A.; Gobre, V. V.; Gejji, S. P.; Puranik, V. G. Synthesis, Electronic Structure, DNA and Protein Binding, DNA Cleavage, and Anticancer Activity of Fluorophore-Labeled Copper(II) Complexes. *Inorg. Chem.*, 2011, 50 (2), 545–558. https://doi.org/10.1021/IC101534N/SUPPL_FILE/IC101534N_SI_001.CIF.
- [60] Basak, R.; Bandyopadhyay, R. Encapsulation of Hydrophobic Drugs in Pluronic F127 Micelles: Effects of Drug Hydrophobicity, Solution Temperature, and PH. *Langmuir*, 2013, 29 (13), 4350–4356. <https://doi.org/10.1021/LA304836E>.
- [61] Vilsinski, B. H.; Aparicio, J. L.; De Souza Pereira, P. C.; Fávares, S. L.; Souza Campanholi, K. S.; Gerola, A. P.; Tessaro, A. L.; Hioka, N.; Caetano, W. Physico-Chemical Properties of Meso-Tetrakis(p-Methoxyphenyl)Porphyrin (TMPP) Incorporated into Pluronic™ p-123 and f-127 Polymeric Micelles. *Quim. Nova*, 2014, 37 (10), 1650–1656. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140273>.
- [62] Diniz, I. M. A.; Chen, C.; Xu, X.; Ansari, S.; Zadeh, H. H.; Marques, M. M.; Shi, S.; Moshaverinia, A. Pluronic F-127 Hydrogel as a Promising Scaffold for Encapsulation of Dental-Derived Mesenchymal Stem Cells. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2015, 26 (3), 153. <https://doi.org/10.1007/S10856-015-5493-4>.
- [63] Kelishady, P. D.; Saadat, E.; Ravar, F.; Akbari, H.; Dorkoosh, F. Pluronic F127 Polymeric Micelles for Co-Delivery of Paclitaxel and Lapatinib against Metastatic Breast Cancer: Preparation, Optimization and in Vitro Evaluation. *Pharm. Dev. Technol.*, 2015, 20 (8), 1009–1017. <https://doi.org/10.3109/10837450.2014.965323>.
- [64] Py-Daniel, K. R.; Namban, J. S.; De Andrade, L. R.; De Souza, P. E. N.; Paterno, L. G.; Azevedo, R. B.; Soler, M. A. G. Highly Efficient Photodynamic Therapy Colloidal System Based on Chloroaluminum Phthalocyanine/Pluronic Micelles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2016, 103, 23–31. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2016.03.028>.
- [65] Karges, J.; Chao, H.; Gasser, G. Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation of the Polymeric Encapsulation of a Ruthenium(II) Polypyridine Complex with Pluronic F-
-

-
- 127/Poloxamer-407 for Photodynamic Therapy Applications. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2020, 2020 (34), 3242–3248. <https://doi.org/10.1002/EJIC.202000545>; JOURNAL: JOURNAL:10990682B.
- [66] Dantas Lopes dos Santos, D.; Besegato, J. F.; de Melo, P. B. G.; Oshiro Junior, J. A.; Chorilli, M.; Deng, D.; Bagnato, V. S.; Rastelli, A. N. de S. Curcumin-Loaded Pluronic® F-127 Micelles as a Drug Delivery System for Curcumin-Mediated Photodynamic Therapy for Oral Application. *Photochem. Photobiol.*, 2021, 97 (5), 1072–1088. <https://doi.org/10.1111/PHP.13433>; WGROUP: STRING: PUBLICATION.
- [67] de Souza, M. V. F.; Shinobu-Mesquita, C. S.; Meirelles, L. E. F.; Mari, N. L.; César, G. B.; Gonçalves, R. S.; Caetano, W.; Damke, E.; Silva, V. R. S.; Damke, G. M. Z. F.; et al. Effects of Hypericin Encapsulated on Pluronic F127 Photodynamic Therapy Against Triple Negative Breast Cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2022, 23 (5), 1741. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2022.23.5.1741>.
- [68] da Silva Souza Campanholi, K.; da Silva, I. C.; dos Santos, R. S.; Vecchi, C. F.; da Silva, J. B.; Bruschi, M. L.; dos Santos Pozza, M. S.; de Castro-Hoshino, L. V.; Baesso, M. L.; Caetano, W.; et al. Thermoresponsive Micellar Emulgel for Topical Release of Rose Bengal Dye and Copaifera Reticulata Ducke: A Phototherapeutic Treatment Alternative. *J. Mol. Liq.*, 2023, 381, 121807. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2023.121807>.
- [69] Bortnevskaia, Y. S.; Zakharov, N. S.; Senkov, V. S.; Gradova, M. A.; Karpechenko, N. Y.; Nikolskaya, E. D.; Mollaeva, M. R.; Yabbarov, N. G.; Novikov, A. S.; Bragina, N. A.; et al. Synthesis, Molecular Docking, and Biological Activity of New EGFR-Targeted Photosensitizers Based on Cationic Porphyrins Encapsulated into Pluronic F127 Micelles. *Mol. Pharm.*, 2025, 22 (6), 3308–3330. <https://doi.org/10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.5C00247>.
- [70] Tsai, S.-R.; Hamblin, M. R. Biological Effects and Medical Applications of Infrared Radiation. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2017, 170, 197–207. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.04.014>.
- [71] Xu, W.; Kneas, K. A.; Demas, J. N.; DeGraff, B. A. Oxygen Sensors Based on Luminescence Quenching of Metal Complexes: Osmium Complexes Suitable for Laser Diode Excitation. *Anal. Chem.*, 1996, 68 (15), 2605–2609. <https://doi.org/10.1021/AC960083V>.
- [72] Urwin, S. J.; Levilain, G.; Marziano, I.; Merritt, J. M.; Houson, I.; Ter Horst, J. H. A Structured Approach To Cope with Impurities during Industrial Crystallization Development. *Org. Process Res. Dev.*, 2020, 24 (8), 1443–1456. <https://doi.org/10.1021/ACS.OPRD.0C00166>.
-

-
- [73] Ahmed, R.; Crawford, N. Retention Factor in Chromatography | Overview & Formula <https://study.com/academy/lesson/retention-factor-in-chromatography-definition-formula-quiz.html> (accessed Dec 15, 2025).
- [74] Mamo, A.; Aureliano, A.; Recca, A. Asymmetric Ruthenium(II) and Osmium(II) Complexes with New Bidentate Polyquinoline Ligands. Synthesis and NMR Characterization. *Molecules*, 2010, *15* (3), 1324–1339. <https://doi.org/10.3390/molecules15031324>.
- [75] Stitch, M.; Boota, R. Z.; Chalkley, A. S.; Keene, T. D.; Simpson, J. C.; Scattergood, P. A.; Elliott, P. I. P.; Quinn, S. J. Photophysical Properties and DNA Binding of Two Intercalating Osmium Polypyridyl Complexes Showing Light-Switch Effects. *Inorg. Chem.*, 2022, *61* (38), 14947–14961. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.2c01231>.
- [76] Denney, R. C. *Dictionary of Spectroscopy*, 2nd ed.; Wiley, Ed.; New York, 1982.
- [77] Detty, M. R.; Gibson, S. L.; Wagner, S. J. Current Clinical and Preclinical Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. *J. Med. Chem.*, 2004, *47* (16), 3897–3915. <https://doi.org/10.1021/JM040074B>.
- [78] Sinha, N.; Wenger, O. S. Photoactive Metal-to-Ligand Charge Transfer Excited States in 3d6 Complexes with Cr0, MnI, FeII, and CoIII. *J. Am. Chem. Soc.*, 2023, *145* (9), 4903–4920. <https://doi.org/10.1021/JACS.2C13432>.
- [79] Suzuki, K.; Kobayashi, A.; Kaneko, S.; Takehira, K.; Yoshihara, T.; Ishida, H.; Shiina, Y.; Oishi, S.; Tobita, S. Reevaluation of Absolute Luminescence Quantum Yields of Standard Solutions Using a Spectrometer with an Integrating Sphere and a Back-Thinned CCD Detector. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2009, *11* (42), 9850–9860. <https://doi.org/10.1039/B912178A>.
- [80] Kandi, D.; Mansingh, S.; Behera, A.; Parida, K. Calculation of Relative Fluorescence Quantum Yield and Urbach Energy of Colloidal CdS QDs in Various Easily Accessible Solvents. *J. Lumin.*, 2021, *231*, 117792. <https://doi.org/10.1016/J.JLUMIN.2020.117792>.
- [81] Balzani, V.; Carassiti, V.; Moggi, L.; Sabbatini, N. Photochemistry of Coordination Compounds. XIV. Electron Transfer and d-d Excitation in Cobalt(III)-Amino Acid Complexes. *Inorg. Chem.*, 2002, *4* (9), 1247–1250. <https://doi.org/10.1021/IC50031A002>.
- [82] Berezin, M. Y.; Achilefu, S. Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. *Chem. Rev.*, 2010, *110* (5), 2641. <https://doi.org/10.1021/CR900343Z>.
- [83] Noakes, F. F.; Smitten, K. L.; Maple, L. E. C.; Bernardino de la Serna, J.; Robertson, C. C.; Pritchard, D.; Fairbanks, S. D.; Weinstein, J. A.; Smythe, C. G. W.; Thomas, J. A. Phenazine
-

-
- Cations as Anticancer Theranostics†. *J. Am. Chem. Soc.*, 2024, *146*, 12836–12849. <https://doi.org/10.1021/JACS.4C03491>.
- [84] Baier, J.; Maisch, T.; Maier, M.; Engel, E.; Landthaler, M.; Bäuml, W. Singlet Oxygen Generation by UVA Light Exposure of Endogenous Photosensitizers. *Biophys. J.*, 2006, *91* (4), 1452–1459. <https://doi.org/10.1529/BIOPHYSJ.106.082388>.
- [85] Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B. Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. An Expanded and Revised Compilation. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 1994, *24*, 663. <https://doi.org/10.1063/1.555965>.
- [86] Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B. Quantum Yields for the Photosensitized Formation of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 1993, *22* (1), 113–262. <https://doi.org/10.1063/1.555934>.
- [87] Beltrán, A.; Mikhailov, M.; Sokolov, M. N.; Pérez-Laguna, V.; Rezusta, A.; Revillo, M. J.; Galindo, F. A Photobleaching Resistant Polymer Supported Hexanuclear Molybdenum Iodide Cluster for Photocatalytic Oxygenations and Photodynamic Inactivation of *Staphylococcus Aureus*. *J. Mater. Chem. B*, 2016, *4* (36), 5975–5979. <https://doi.org/10.1039/C6TB01966H>.
- [88] İspir, E.; İnal, M.; Gün Gök, Z.; Yiğitoğlu, M. Synthesis, Characterization and in Vitro Release Analysis of Pluronic F127 Copolymer Micelles Containing Quercetin as a Hydrophobic Drug. *Polymer Bulletin* 2023 *81*:8, 2023, *81* (8), 6801–6822. <https://doi.org/10.1007/S00289-023-05040-9>.
- [89] Park, J. H.; Lee, S.; Kim, J. H.; Park, K.; Kim, K.; Kwon, I. C. Polymeric Nanomedicine for Cancer Therapy. *Prog. Polym. Sci.*, 2008, *33* (1), 113–137. <https://doi.org/10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2007.09.003>.
- [90] Jhaveri, A. M.; Torchilin, V. P. Multifunctional Polymeric Micelles for Delivery of Drugs and siRNA. *Front. Pharmacol.*, 2014, *5*, 77. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2014.00077>.
- [91] Meng, X.; Liu, J.; Yu, X.; Li, J.; Lu, X.; Shen, T. Pluronic F127 and D- α -Tocopheryl Polyethylene Glycol Succinate (TPGS) Mixed Micelles for Targeting Drug Delivery across The Blood Brain Barrier. *Scientific Reports* 2017 *7*:1, 2017, *7* (1), 2964-. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03123-y>.
- [92] Alkan, A. B.; Arslanhan, E. N. D.; Bahadori, F.; Kasapoglu, M. Z.; Akbas, F.; Susgun, S.; Eskandari, Z.; Oner, E. T.; Alkan, A. B.; Arslanhan, E. N. D.; et al. Effects of Polysaccharide Coating on Cell-Surface Association and Endocytic Uptake of PLGA Nanomicelles in MCF-7
-

-
- Cells. *Pharmaceutics* 2026, Vol. 18, 2025, 18 (1), 17. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS18010017>.
- [93] Qiu, Z.; Liu, W.; Zhu, Q.; Ke, K.; Zhu, Q.; Jin, W.; Yu, S.; Yang, Z.; Li, L.; Sun, X.; et al. The Role and Therapeutic Potential of Macropinocytosis in Cancer. *Front. Pharmacol.*, 2022, 13, 919819. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.919819/FULL>.
- [94] Jiang, G.; Wei, C.; Chen, Y.; Lyu, Y.; Huang, J.; Chen, H.; Gao, X. Targeted Drug Delivery System Inspired by Macropinocytosis. *Journal of Controlled Release*, 2023, 359, 302–314. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2023.06.011>.
- [95] Al-Humaidi, R. B.; Fayed, B.; Shakartalla, S. B.; Jagal, J.; Jayakumar, M. N.; Al Shareef, Z. M.; Sharif, S. I.; Noreddin, A.; Semreen, M. H.; Omar, H. M.; et al. Optimum Inhibition of MCF-7 Breast Cancer Cells by Efficient Targeting of the Macropinocytosis Using Optimized Paclitaxel-Loaded Nanoparticles. *Life Sci.*, 2022, 305, 120778. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2022.120778>.
- [96] Barba, I.; Carrillo-Bosch, L.; Seoane, J.; Barba, I.; Carrillo-Bosch, L.; Seoane, J. Targeting the Warburg Effect in Cancer: Where Do We Stand? *International Journal of Molecular Sciences* 2024, Vol. 25, 2024, 25 (6). <https://doi.org/10.3390/IJMS25063142>.
- [97] Hosonuma, M.; Yoshimura, K. Association between PH Regulation of the Tumor Microenvironment and Immunological State. *Front. Oncol.*, 2023, 13, 1175563. <https://doi.org/10.3389/FONC.2023.1175563/BIBTEX>.
- [98] Feng, L.; Dong, Z.; Tao, D.; Zhang, Y.; Liu, Z. The Acidic Tumor Microenvironment: A Target for Smart Cancer Nano-Theranostics. *Natl. Sci. Rev.*, 2018, 5 (2), 269–286. <https://doi.org/10.1093/NSR/NWX062>.
- [99] Zong, J.; Peng, H.; Qing, X.; Fan, Z.; Xu, W.; Du, X.; Shi, R.; Zhang, Y. PH-Responsive Pluronic F127–Lenvatinib-Encapsulated Halogenated Boron-Dipyrromethene Nanoparticles for Combined Photodynamic Therapy and Chemotherapy of Liver Cancer. *ACS Omega*, 2021, 6 (18), 12331–12342. <https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.1C01346>.
- [100] Neto, J. C.; Lucantoni, F.; González, L. V.; Falomir, E.; Miravet, J. F.; Galindo, F. Introducing TAPY as a Versatile Alternative to TPP for Selective Mitochondrial Targeting in Cancer Cells. *Bioconjug. Chem.*, 2025, 36 (4), 697–706. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCONJCHEM.4C00554>.
- [101] Baliyan, A.; Imai, H.; Kumar, V. Microscopy. *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources*, 2019, 97–117. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816548-5.00007-1>.
-

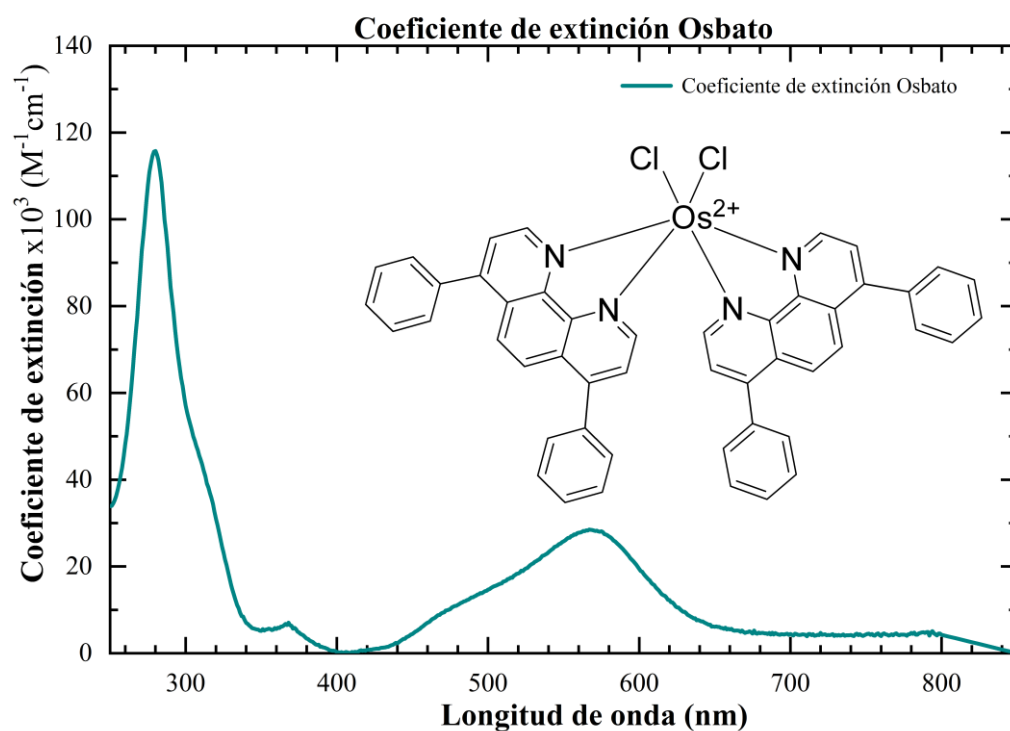
-
- [102] Fisher Scientific. Invitrogen LysoTracker Deep Red <https://www.fishersci.es/shop/products/molecular-probes-lysotracker-deep-red/15107482> (accessed Dec 17, 2025).
- [103] Chu, C. H.; Tseng, W. W.; Hsu, C. M.; Wei, A. C. Image Analysis of the Mitochondrial Network Morphology With Applications in Cancer Research. *Front. Phys.*, 2022, 10, 855775. <https://doi.org/10.3389/FPHY.2022.855775/BIBTEX>.
- [104] Salazar, Ó. ¿Qué es la escala de madurez tecnológica (TRL)? <https://euro-funding.com/es/blog/que-es-la-escala-de-madurez-tecnologica-trl/> (accessed Dec 25, 2025).
- [105] Munich Business School. CAPEX <https://www.munich-business-school.de/es/l/diccionario-de-estudios-empresariales/capex> (accessed Dec 2, 2025).
- [106] Tusalarior.org/Chile. Técnicos de laboratorios médicos <https://tusalarior.org/chile/carrera/funcion-y-salario/tecnicos-de-laboratorios-medicos-o-patologicos> (accessed Dec 6, 2025).
- [107] Chu, H. Good Net Profit Margin: The 2025 Benchmarks Revealed <https://trueprofit.io/blog/what-is-a-good-net-profit-margin> (accessed Dec 6, 2025).
- [108] Centro latinoamericano de Políticas Económicas y Sociales. INFLACIÓN ANUALIZADA DEL IPC MED MANTIENE POR SEGUNDO MES UNA AMPLIA BRECHA POR SOBRE EL IPC DEL INE. 2025.
- [109] Instituto Nacional de Propiedad Industrial. Patentes <https://www.inapi.cl/patentes/tipos-de-patentes/invencion> (accessed Dec 6, 2025).
- [110] CFI Team; Schmidt, J. ¿Qué son los ingresos? Definición, ejemplos y cómo calcularlos | CFI <https://corporatefinanceinstitute.com/resources/accounting/revenue/> (accessed Dec 25, 2025).
- [111] Doyle, M. Variable Cost: Formula, Definition, and Examples <https://www.americanexpress.com/en-us/business/trends-and-insights/articles/variable-cost-formula-definition-and-examples/> (accessed Dec 25, 2025).
- [112] Block Advisors. What is Depreciation and How to Calculate Depreciation Expense? <https://www.blockadvisors.com/resource-center/finance/calculating-depreciation/> (accessed Dec 25, 2025).
- [113] Paddle. What is EBIT (Earnings Before Income and Taxes) & how it helps evaluate business performance <https://www.paddle.com/resources/earnings-before-interest-taxes> (accessed Dec 25, 2025).

-
- [114] Servicio de Impuestos Internos. Regímenes Tributarios https://www.sii.cl/destacados/renta/2025/regimenes_renta2025.html (accessed Dec 6, 2025).
- [115] Cámara Madrid, E. de N. Qué es el VAN, ¿Cómo se calcula y se interpreta? <https://www.mba-madrid.com/economia/valor-actual-neto-van/> (accessed Dec 25, 2025).
- [116] Velayos Morales, V.; Sevilla Arias, A. Valor actual neto (VAN): Qué es y cómo utilizarlo <https://economipedia.com/definiciones/valor-actual-neto.html> (accessed Dec 6, 2025).
- [117] Fernando, J.; Khartit, K.; Eichler, R. Internal Rate of Return (IRR): Formula and Examples <https://www.investopedia.com/terms/i/irr.asp> (accessed Dec 6, 2025).
- [118] Blatcher, R. Rentabilidad de un proyecto <https://www.wrike.com/es/professional-services-guide/rentabilidad-de-un-proyecto/> (accessed Dec 6, 2025).
- [119] Kulkarni, G. S.; Richards, K. A.; Black, P. C.; Rendon, R. A.; Chin, J.; Shore, N. D.; Jayram, G.; Kramolowsky, E. V.; Saltzstein, D.; Agarwal, P. K.; et al. A Phase II Clinical Study of Intravesical Photo Dynamic Therapy in Patients with BCG-Unresponsive NMIBC (Interim Analysis). *Journal of Clinical Oncology*, 2023, 41 (6_suppl), 528–528. https://doi.org/10.1200/JCO.2023.41.6_SUPPL.528.
- [120] Omar, S. A. E.; Scattergood, P. A.; McKenzie, L. K.; Jones, C.; Patmore, N. J.; Meijer, A. J. H. M.; Weinstein, J. A.; Rice, C. R.; Bryant, H. E.; Elliott, P. I. P. Photophysical and Cellular Imaging Studies of Brightly Luminescent Osmium(II) Pyridyltriazole Complexes. *Inorg. Chem.*, 2018, 57 (21), 13201–13212. <https://doi.org/10.1021/ACS.INORGCHEM.8B01627>.
- [121] Kober, E. M.; Marshall, J. L.; Dressick, W. J.; Sullivan, B. P.; Caspar, J. V.; Meyer, T. J. Synthetic Control of Excited States. Nonchromophoric Ligand Variations in Polypyridyl Complexes of Osmium(II). *Inorg. Chem.*, 1985, 24 (18), 2755–2763. <https://doi.org/10.1021/IC00212A010>.
- [122] Redmond, R. W.; GamLin, J. N. A Compilation of Singlet Oxygen Yields from Biologically Relevant Molecules. *Photochem. Photobiol.*, 1999, 70 (4), 391–475. <https://doi.org/10.1111/J.1751-1097.1999.TB08240.X>.
- [123] Shi, R.; Li, C.; Jiang, Z.; Li, W.; Wang, A.; Wei, J.; Shi, R.; Li, C.; Jiang, Z.; Li, W.; et al. Preclinical Study of Antineoplastic Sinoporphyrin Sodium-PDT via In Vitro and In Vivo Models. *Molecules* 2017, Vol. 22, 2017, 22 (1). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES22010112>.
- [124] Chamberlain, S.; Cole, H. D.; Roque, J.; Bellnier, D.; McFarland, S. A.; Shafirstein, G. TLD1433-Mediated Photodynamic Therapy with an Optical Surface Applicator in the
-

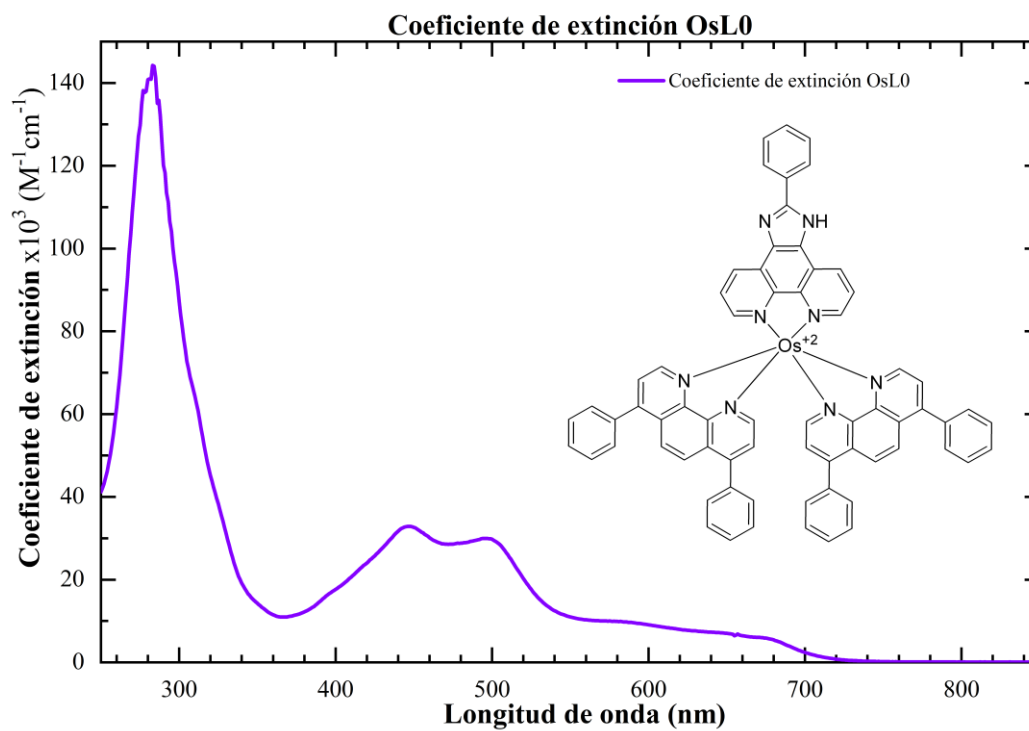
Treatment of Lung Cancer Cells In Vitro. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2020, 13 (7), 1–9.
<https://doi.org/10.3390/PH13070137>.

- [125] Van Rijt, S. H.; Romero-Canelón, I.; Fu, Y.; Shnyder, S. D.; Sadler, P. J. Potent Organometallic Osmium Compounds Induce Mitochondria-Mediated Apoptosis and S-Phase Cell Cycle Arrest in A549 Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Metallomics*, 2014, 6 (5), 1014–1022.
<https://doi.org/10.1039/C4MT00034J>.

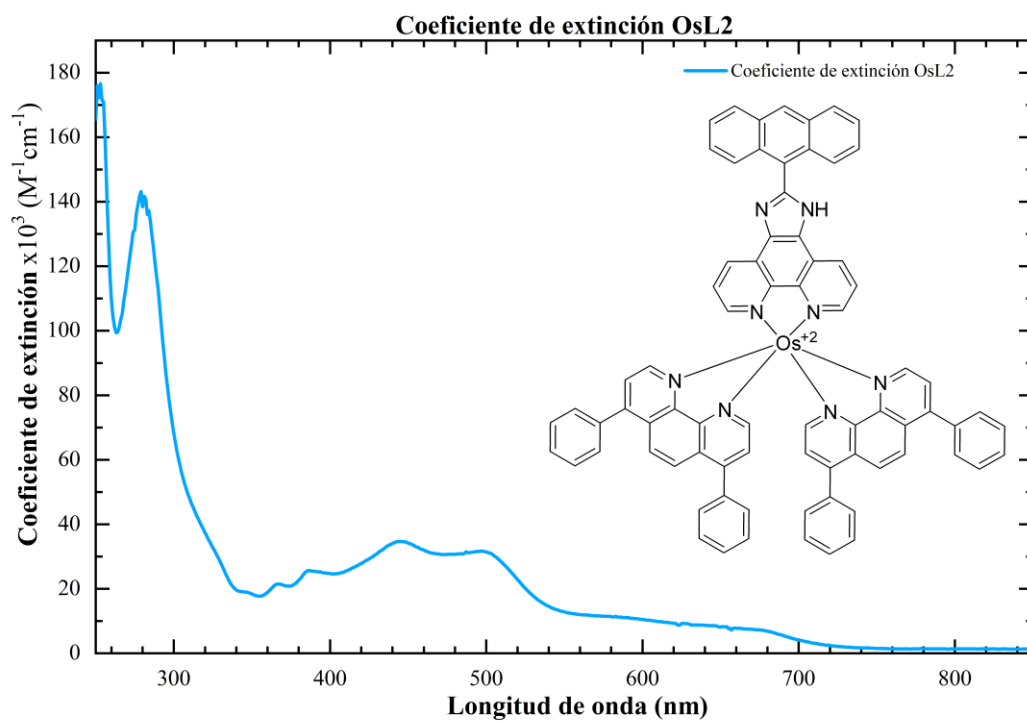
Anexo – Gráficos de coeficiente de extinción



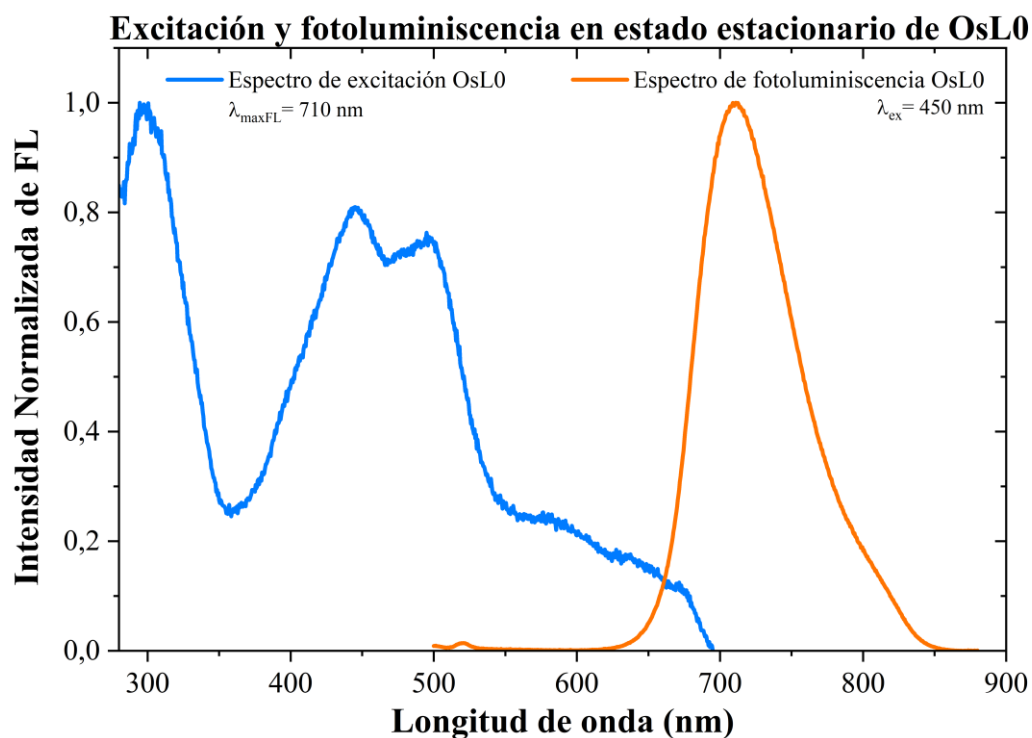
Anexo-Figura 1. Coeficiente de extinción Osbato.



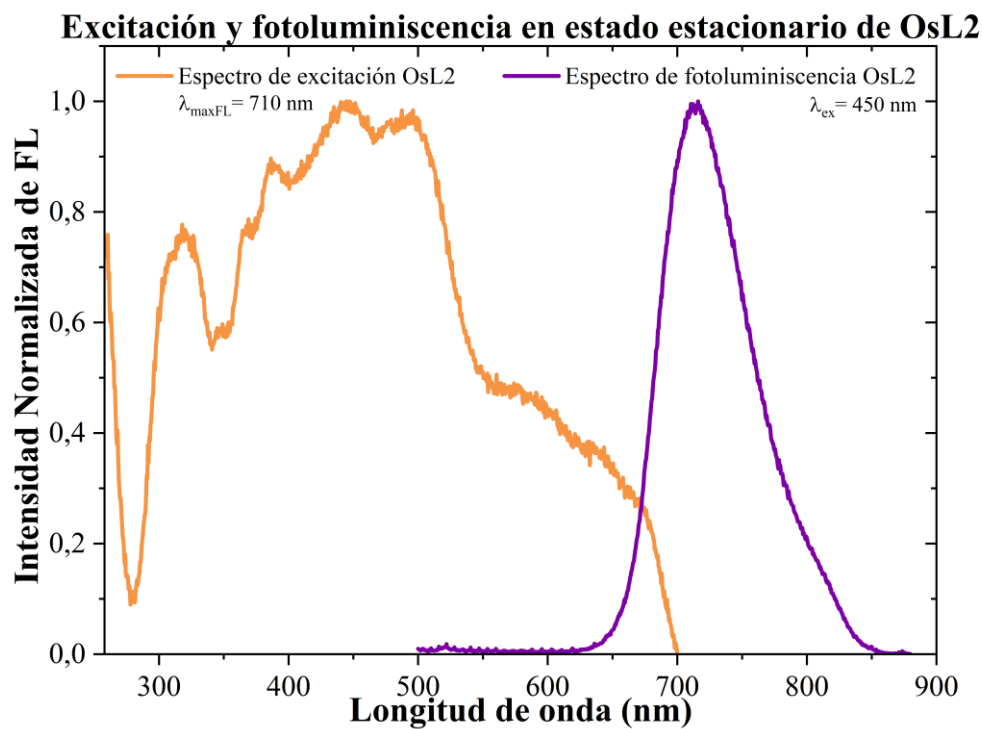
Anexo-Figura 2. Coeficiente de extinción OsL0.



Anexo-Figura 3. Coeficiente de extinción OsL2.

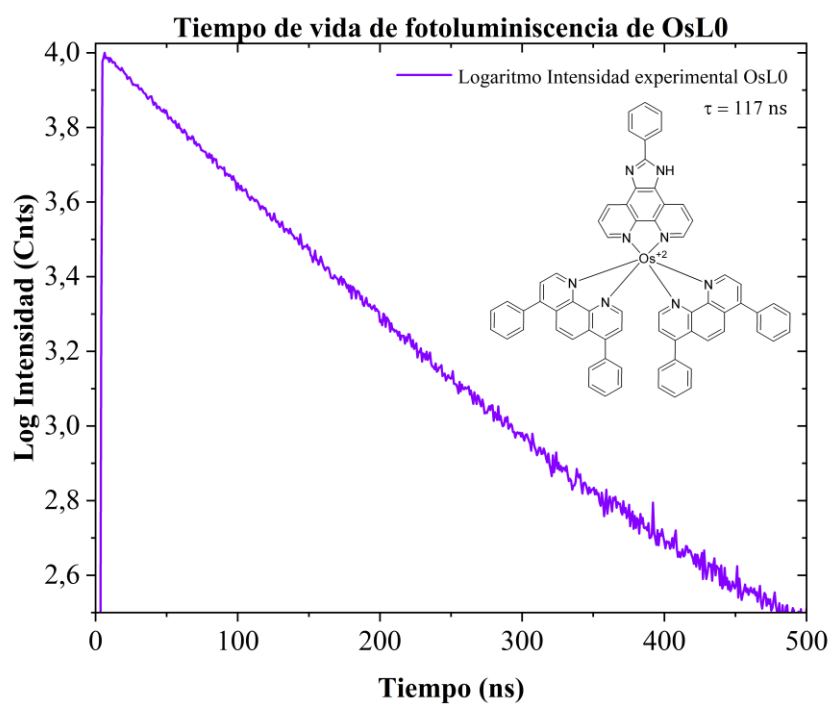


Anexo-Figura 4. Espectro de excitación y espectro de fotoluminiscencia en estado estacionario OsL0.

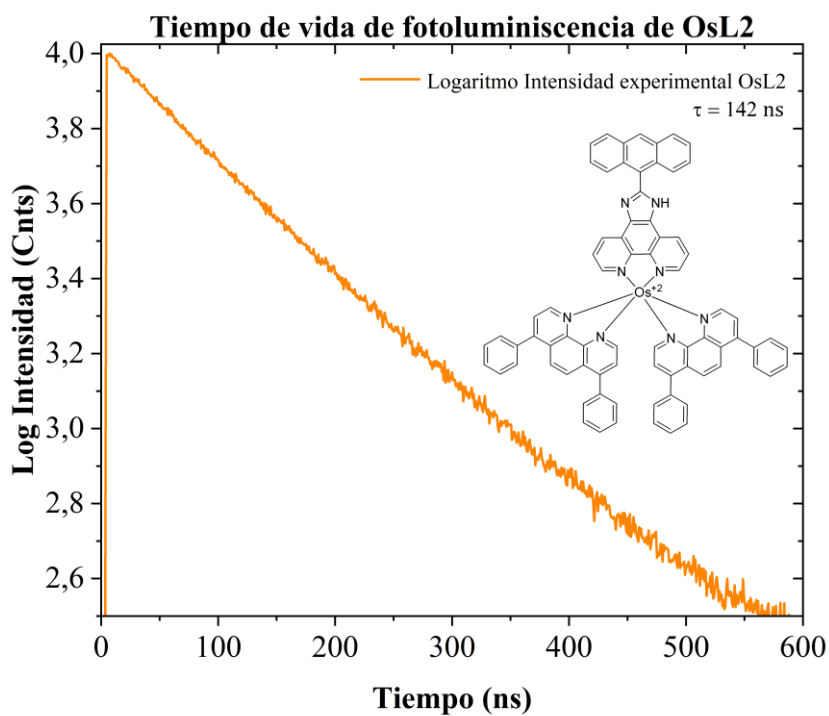


Anexo-Figura 5. Espectro de excitación y espectro de fotoluminiscencia en estado estacionario OsL2.

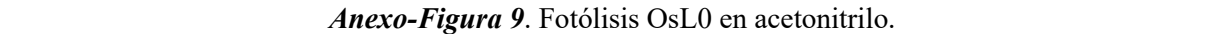
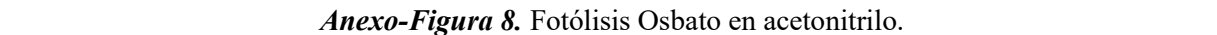
Anexo – Tiempo de vida de fotoluminiscencia

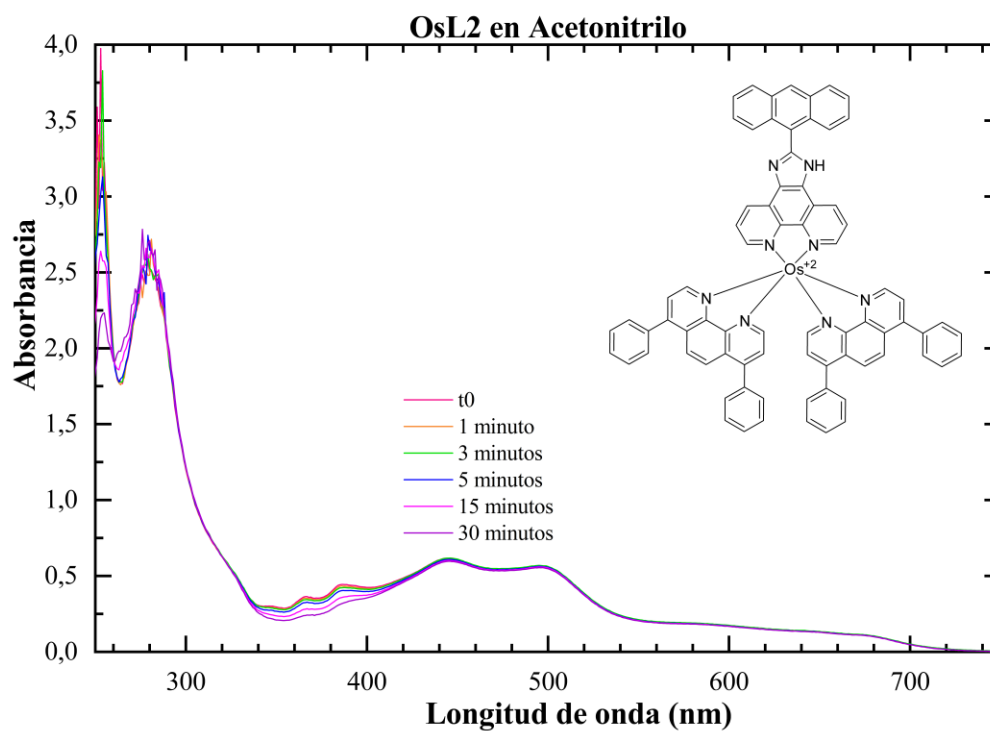


Anexo-Figura 6. Tiempo de vida de fotoluminiscencia de OsL0.

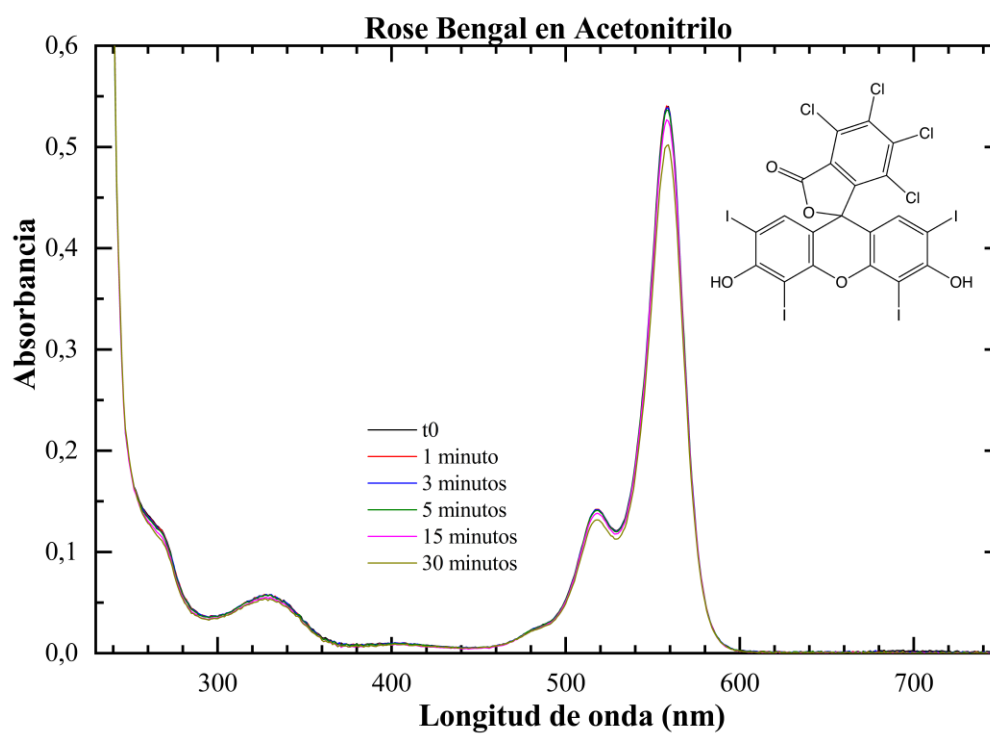


Anexo-Figura 7. Tiempo de vida de fotoluminiscencia de OsL2.

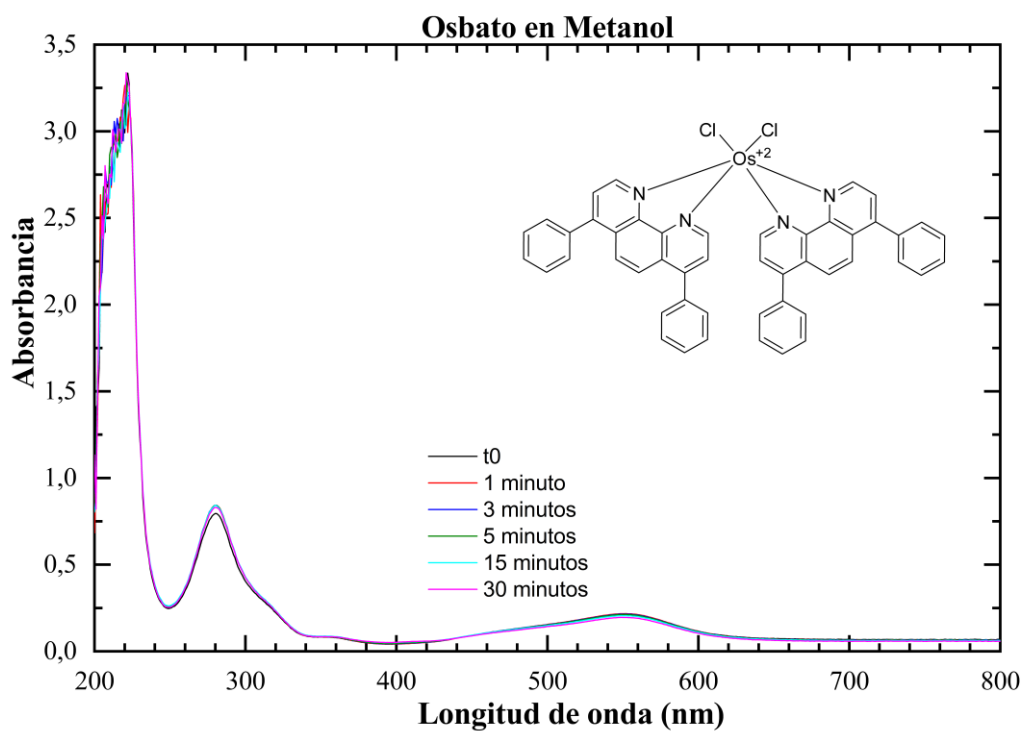




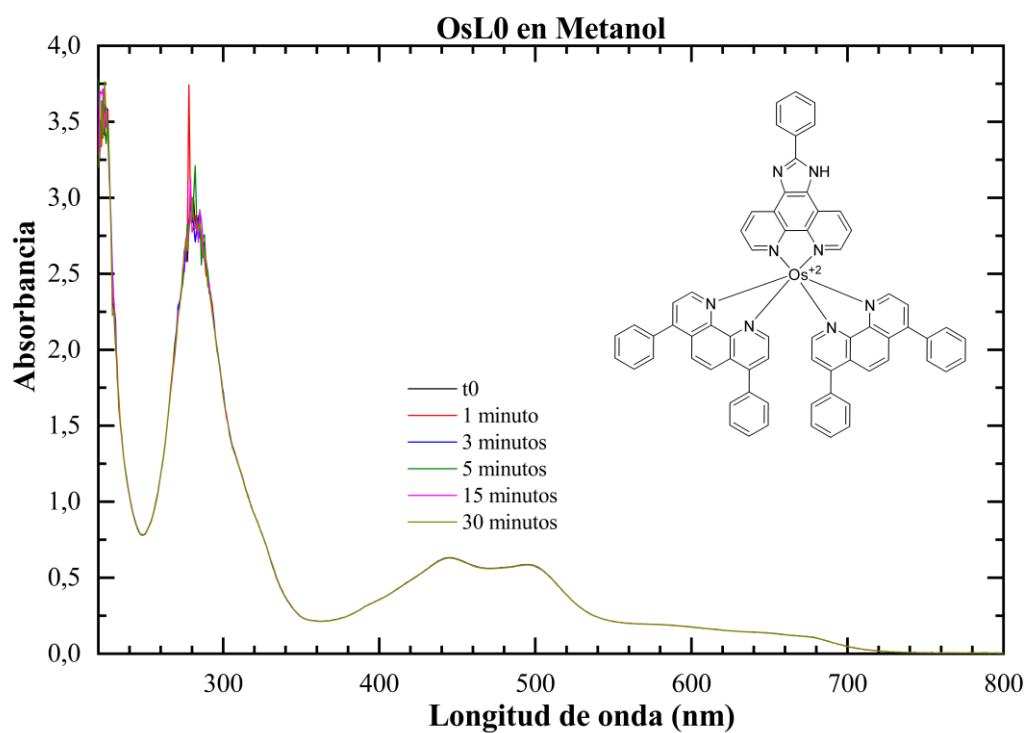
Anexo-Figura 10. Fotólisis OsL2 en acetonitrilo.



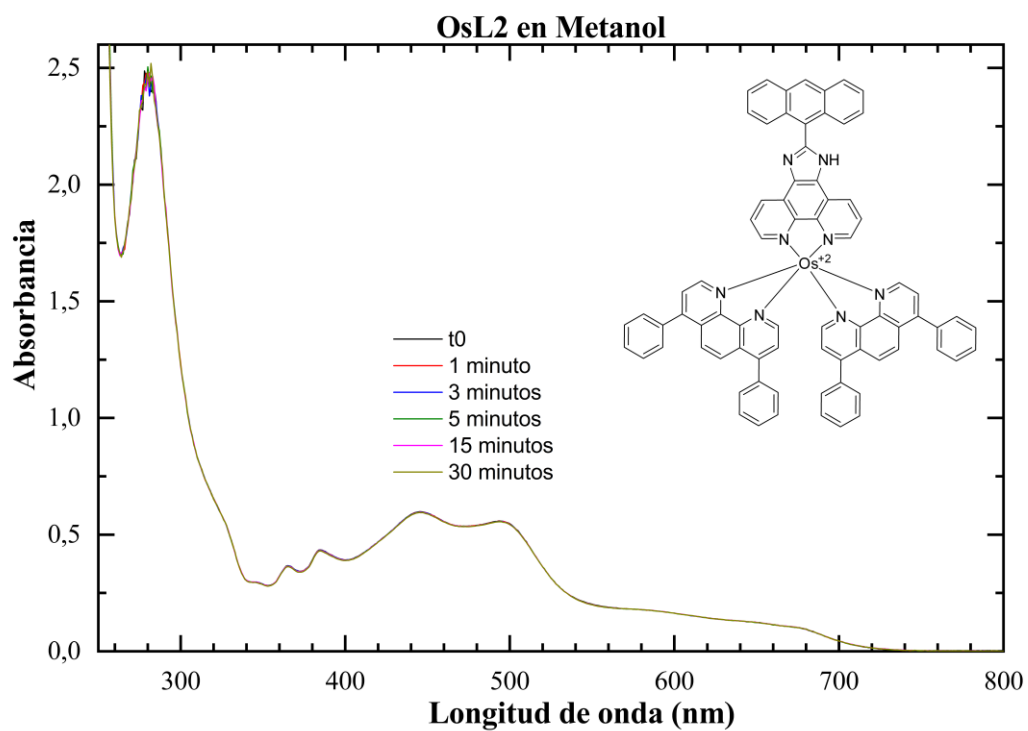
Anexo-Figura 11. Fotólisis RB en acetonitrilo.



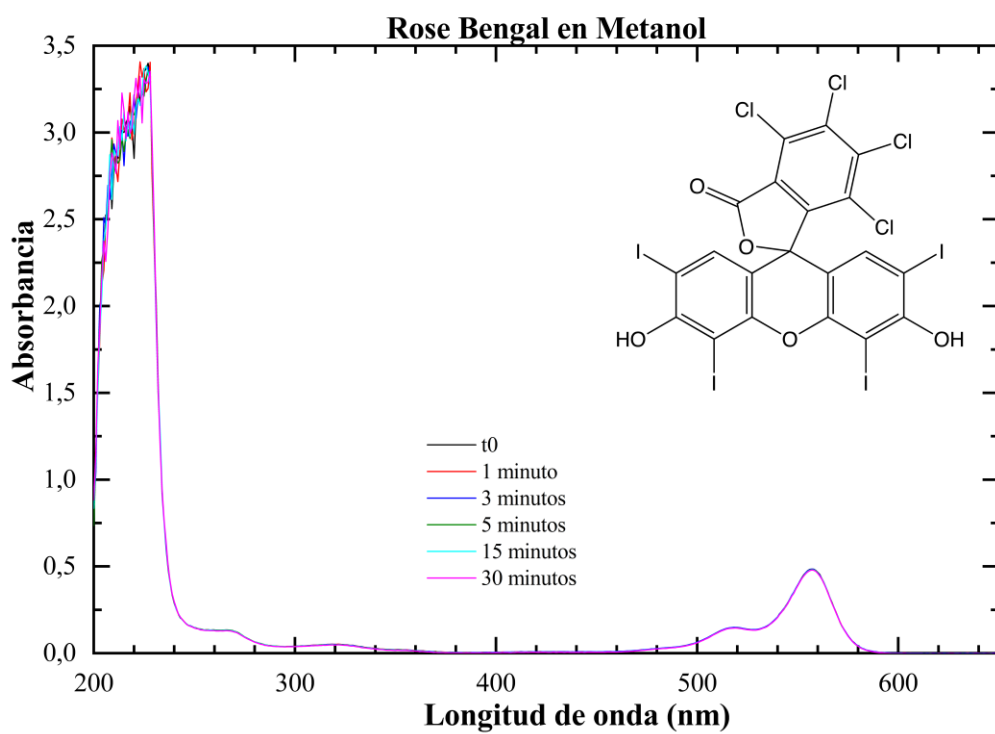
Anexo-Figura 12. Fotólisis Osbato en metanol.



Anexo-Figura 13. Fotólisis OsL0 en metanol.

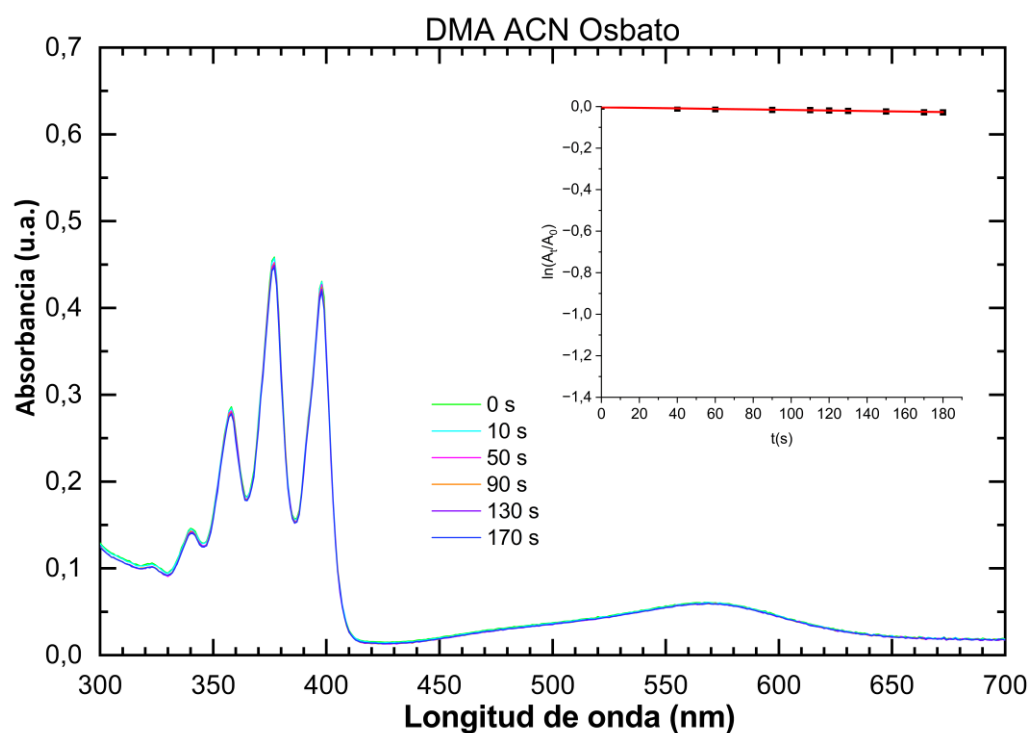


Anexo-Figura 14. Fotólisis OsL2 en metanol.

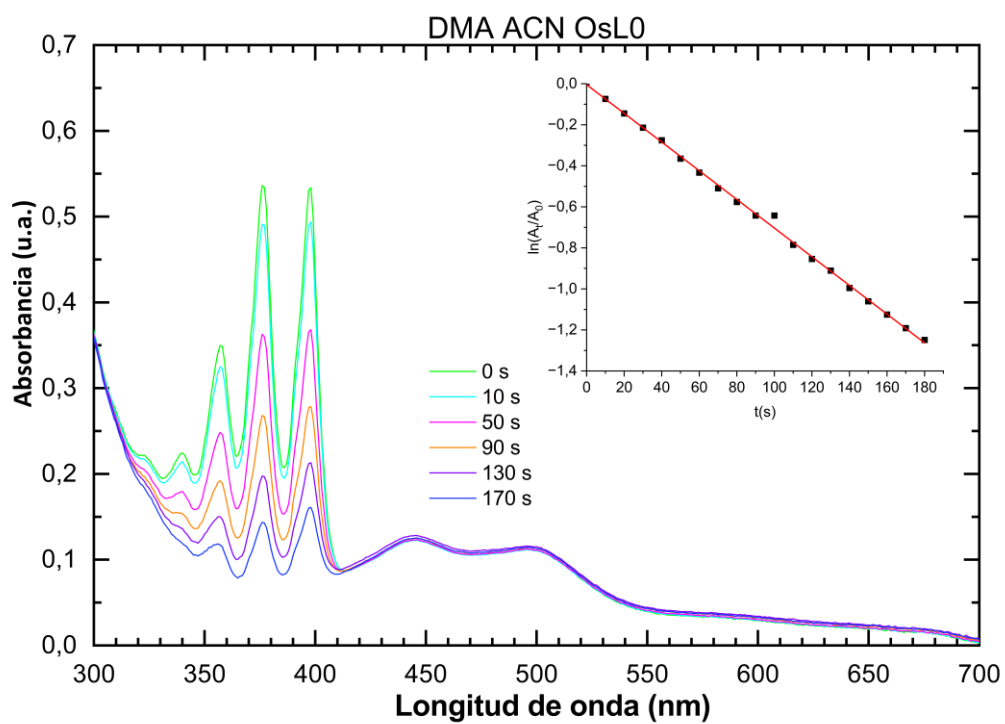


Anexo-Figura 15. Fotólisis RB en metanol.

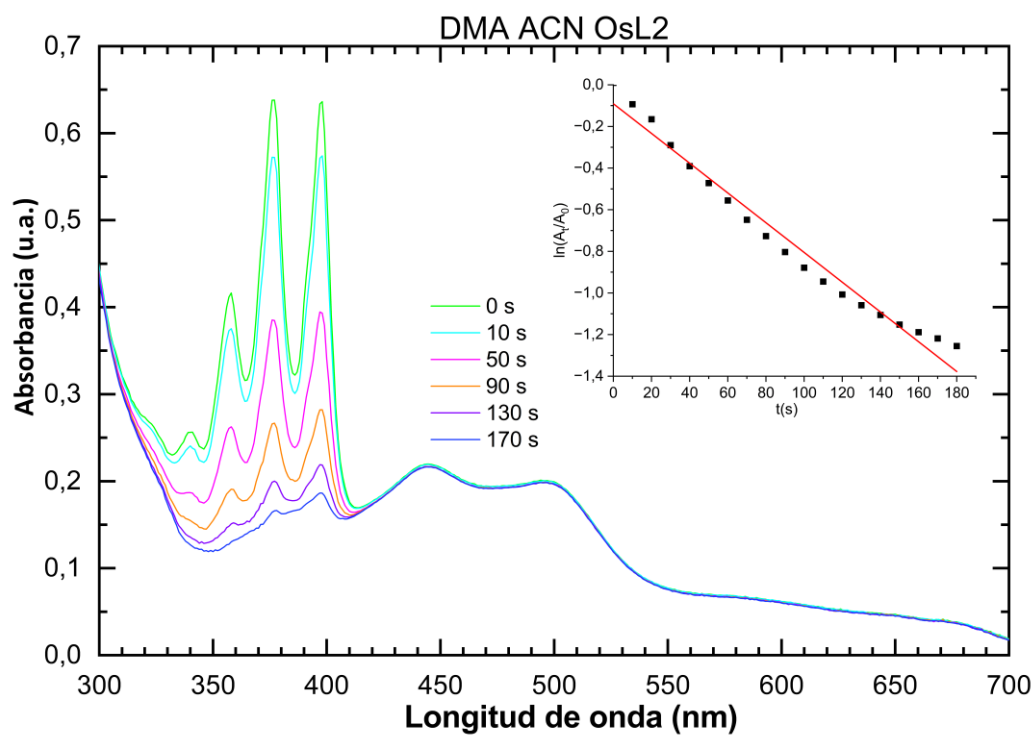
Anexo – Gráficos de fotoxidación



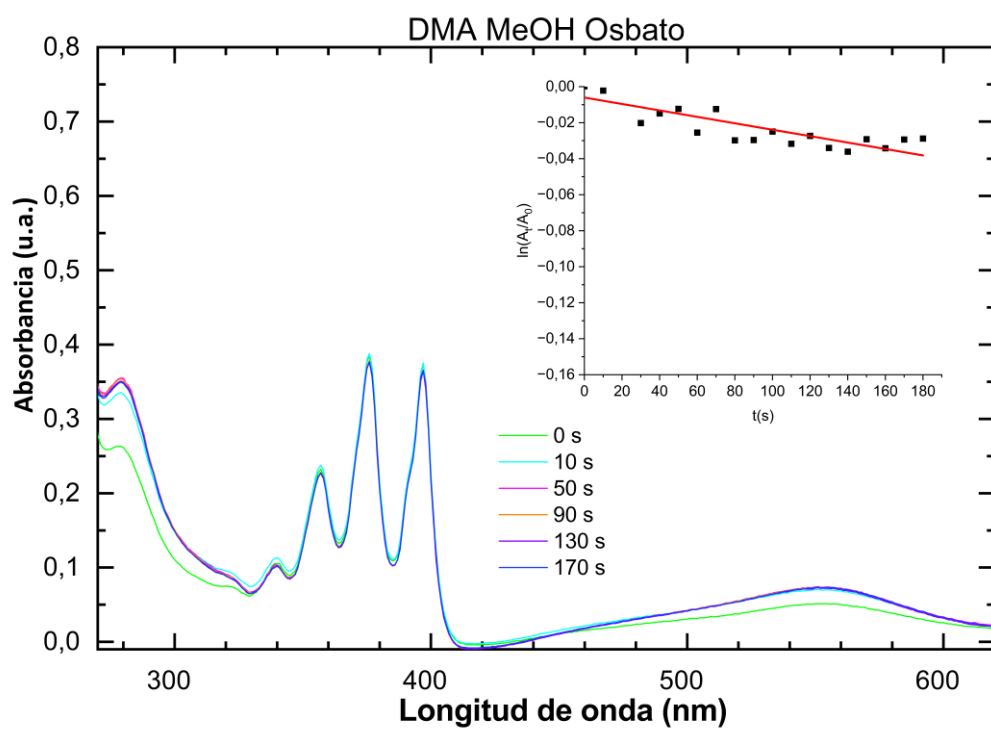
Anexo-Figura 16. Fotoxidación de DMA con Osbato en acetonitrilo.



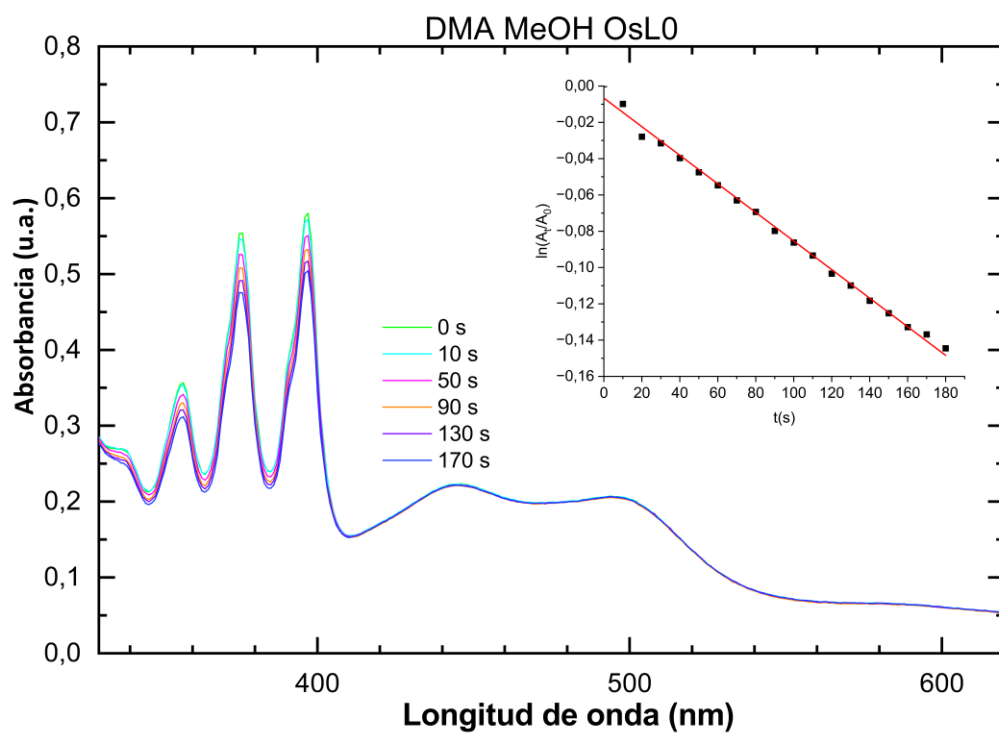
Anexo-Figura 17. Fotoxidación de DMA con OsL0 en acetonitrilo.



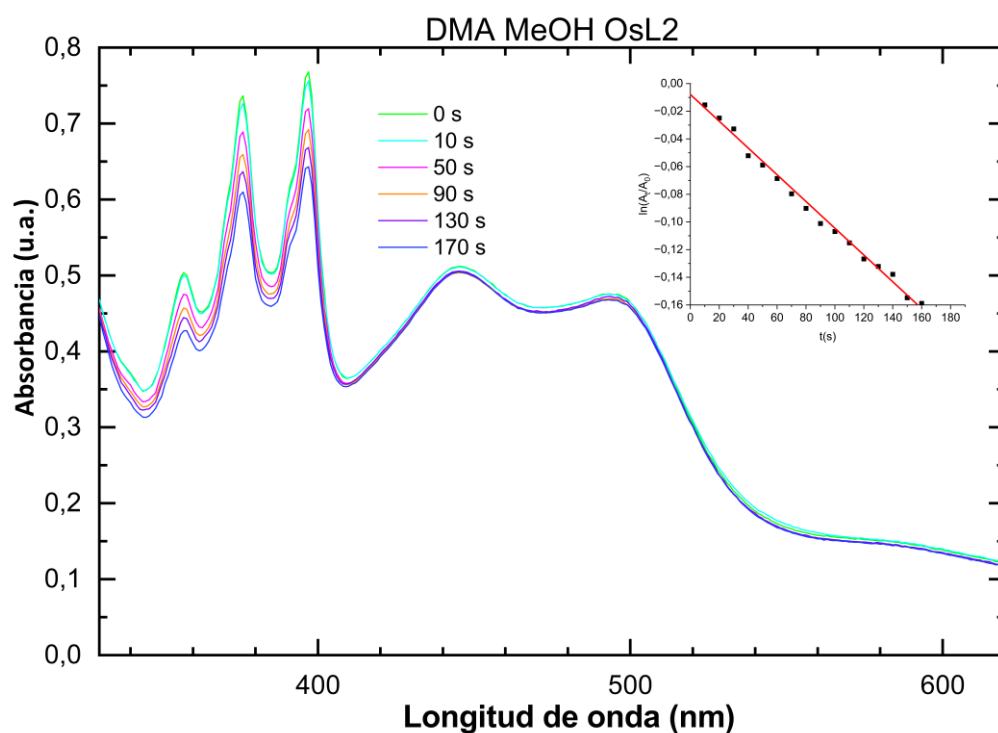
Anexo-Figura 18. Fotoxidación de DMA con OsL2 en acetonitrilo.



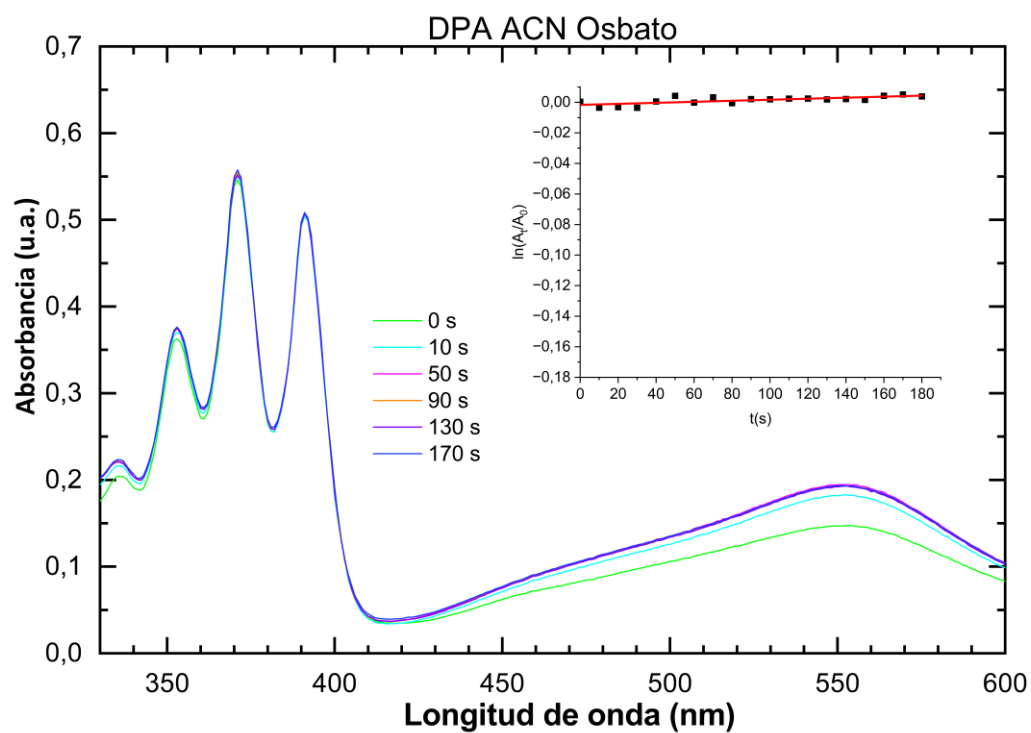
Anexo-Figura 19. Fotoxidación de DMA con Osbato en metanol.



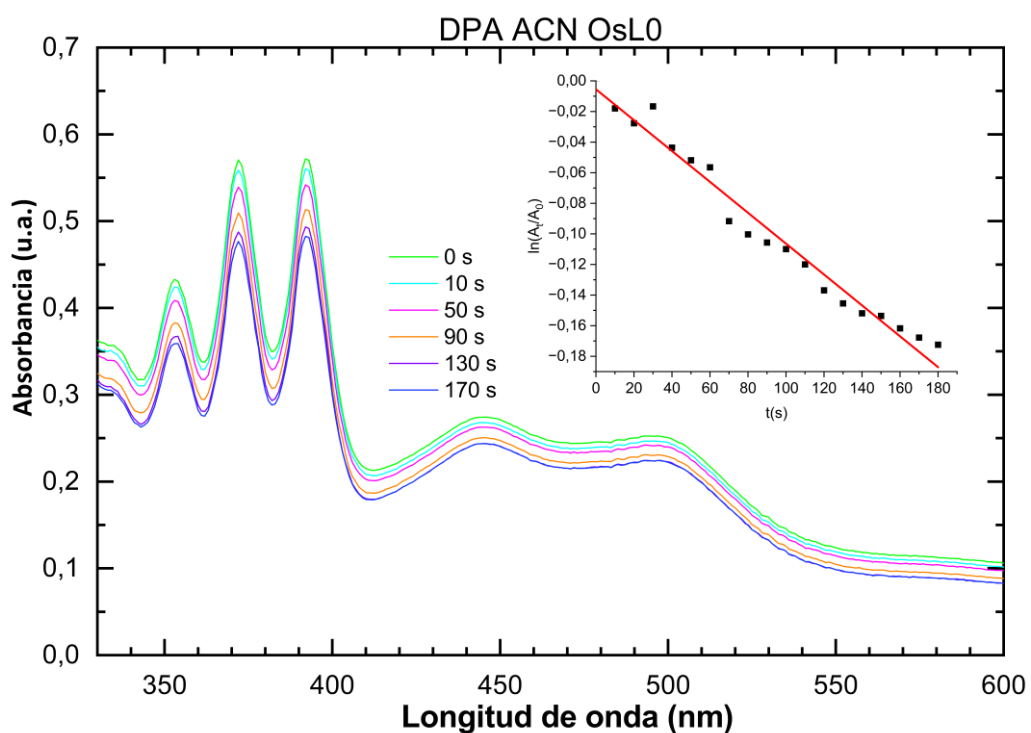
Anexo-Figura 20. Fotoxidación de DMA con OsL0 en metanol.



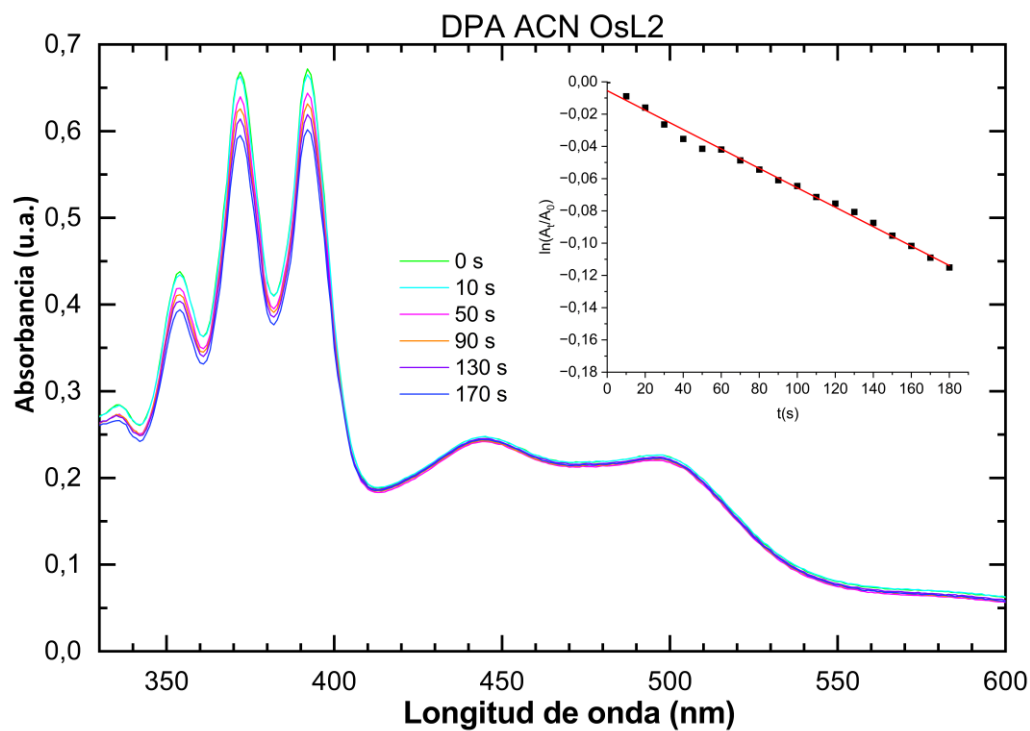
Anexo-Figura 21. Fotoxidación de DMA con OsL2 en metanol.



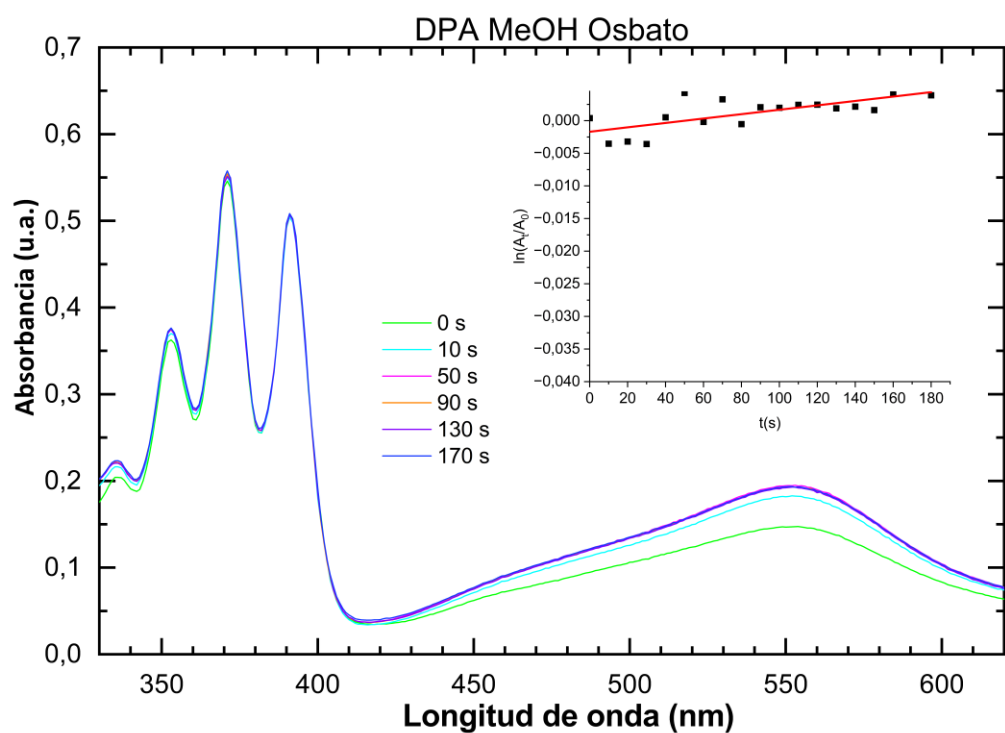
Anexo-Figura 22. Fotoxidación de DPA con Osbato en acetonitrilo.



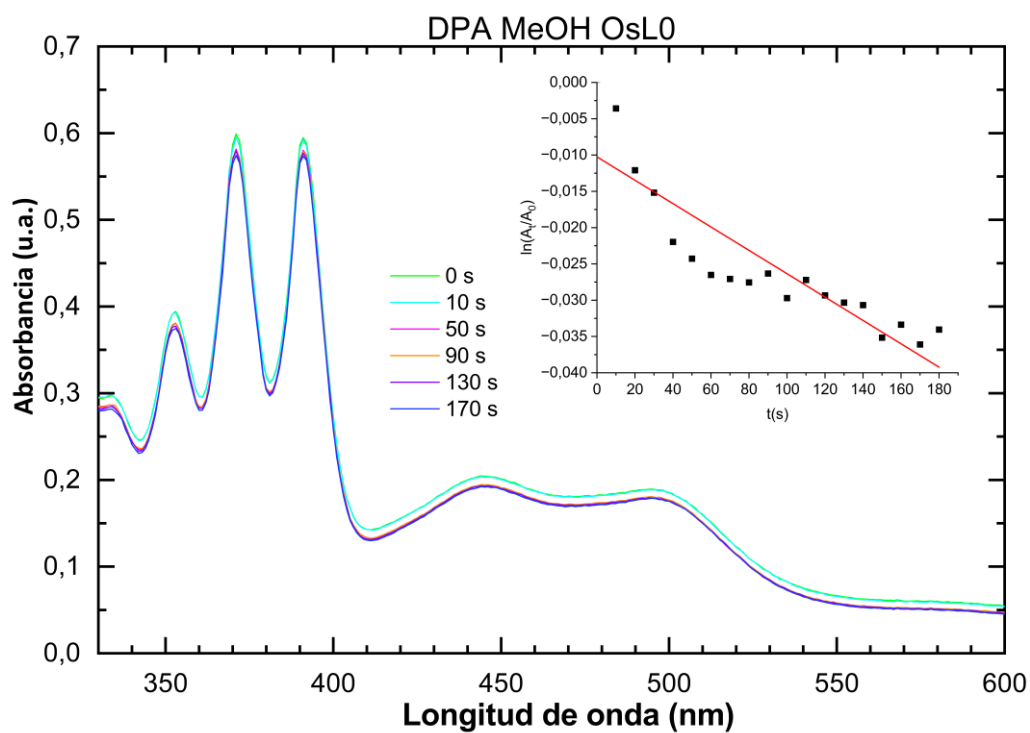
Anexo-Figura 23. Fotoxidación de DPA con OsL0 en acetonitrilo.



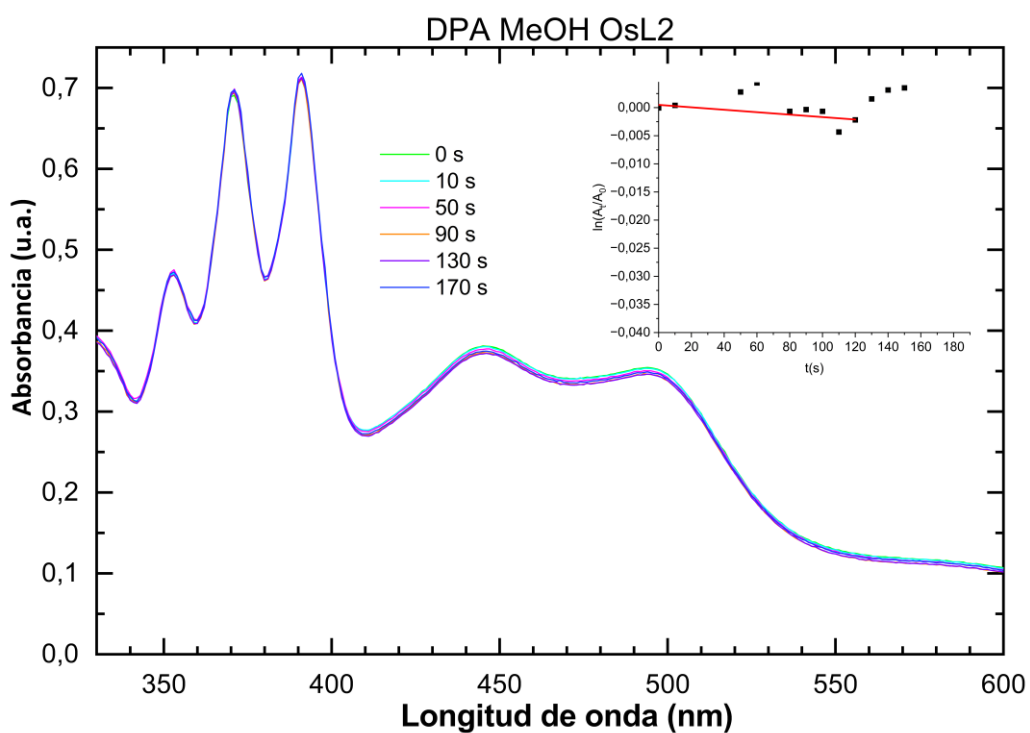
Anexo-Figura 24. Fotooxidación de DPA con OsL2 en acetonitrilo.



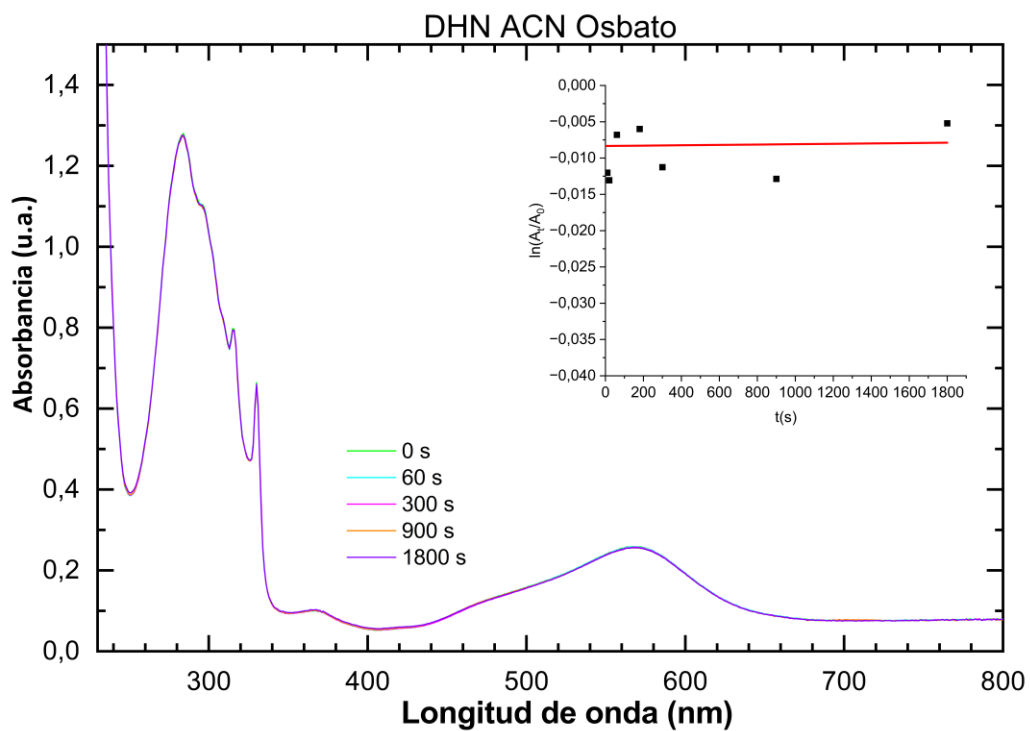
Anexo-Figura 25. Fotooxidación de DPA con Osbato en metanol.



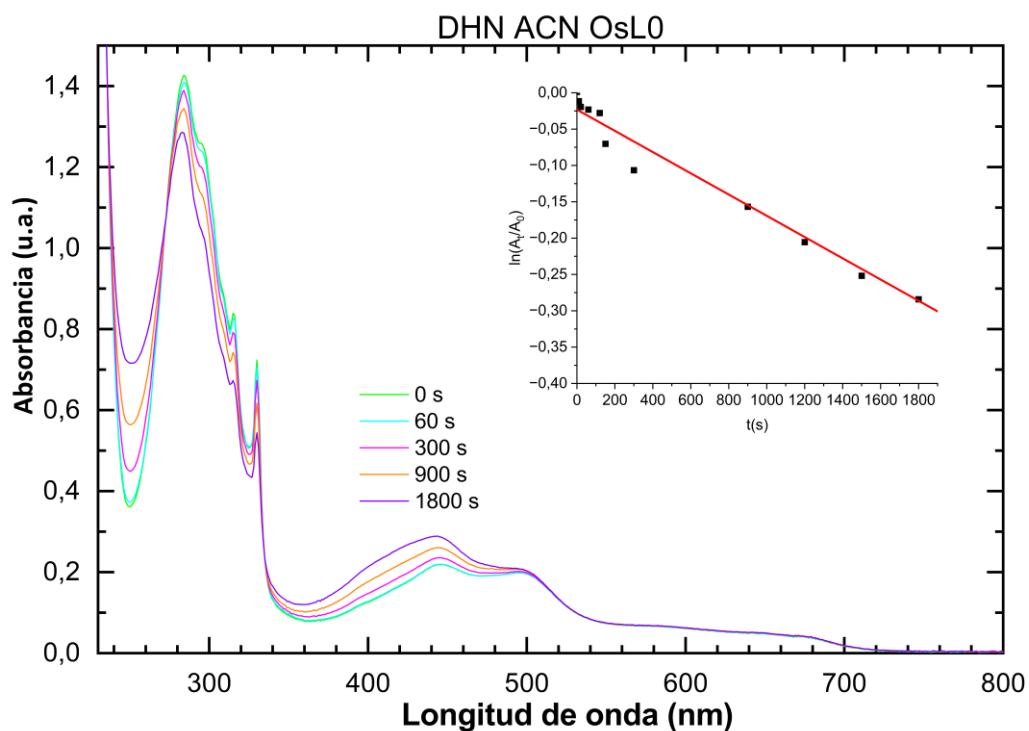
Anexo-Figura 26. Fotooxidación de DPA con OsL0 en metanol.



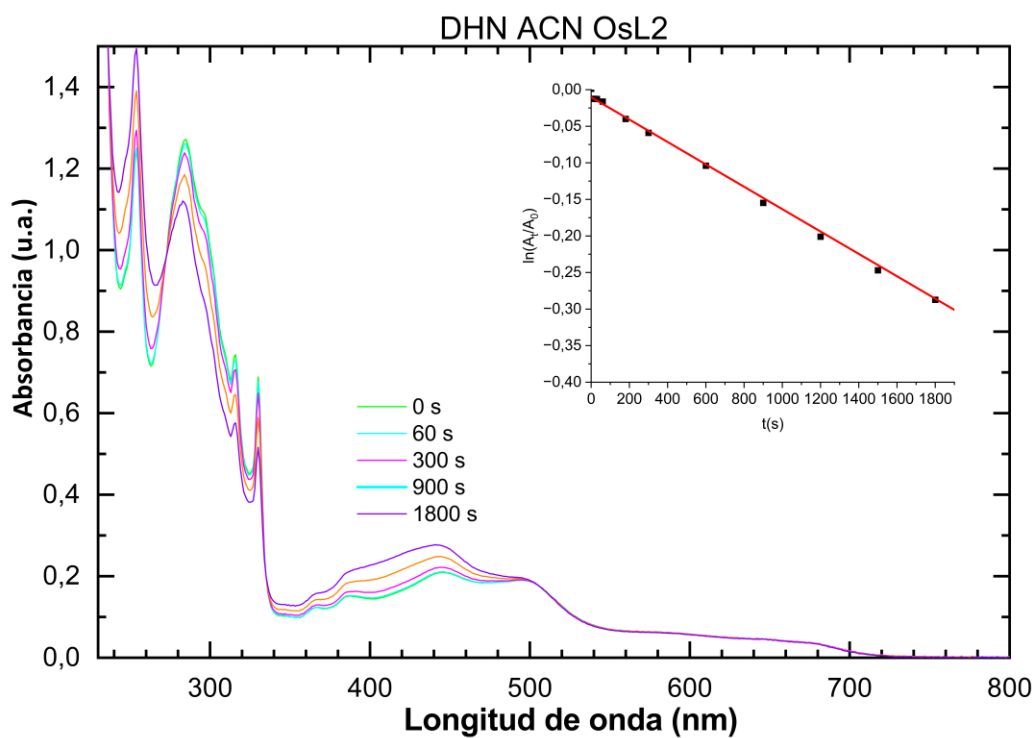
Anexo-Figura 27. Fotooxidación de DPA con OsL2 en metanol.



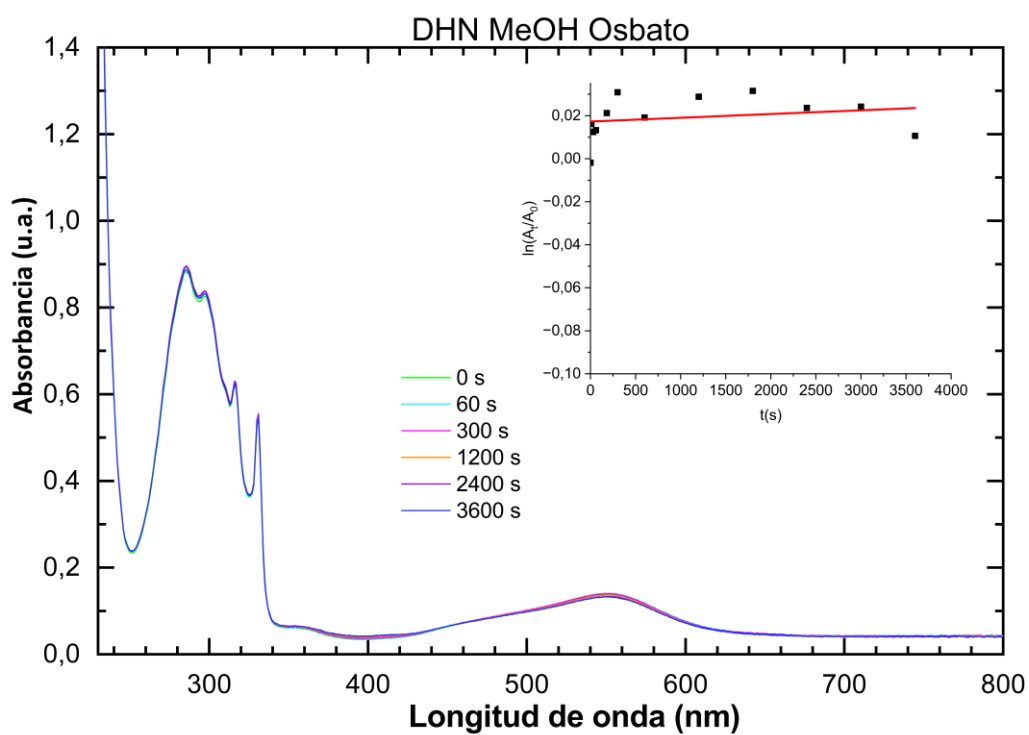
Anexo-Figura 28. Fotooxidación de DHN con Osbato en acetonitrilo.



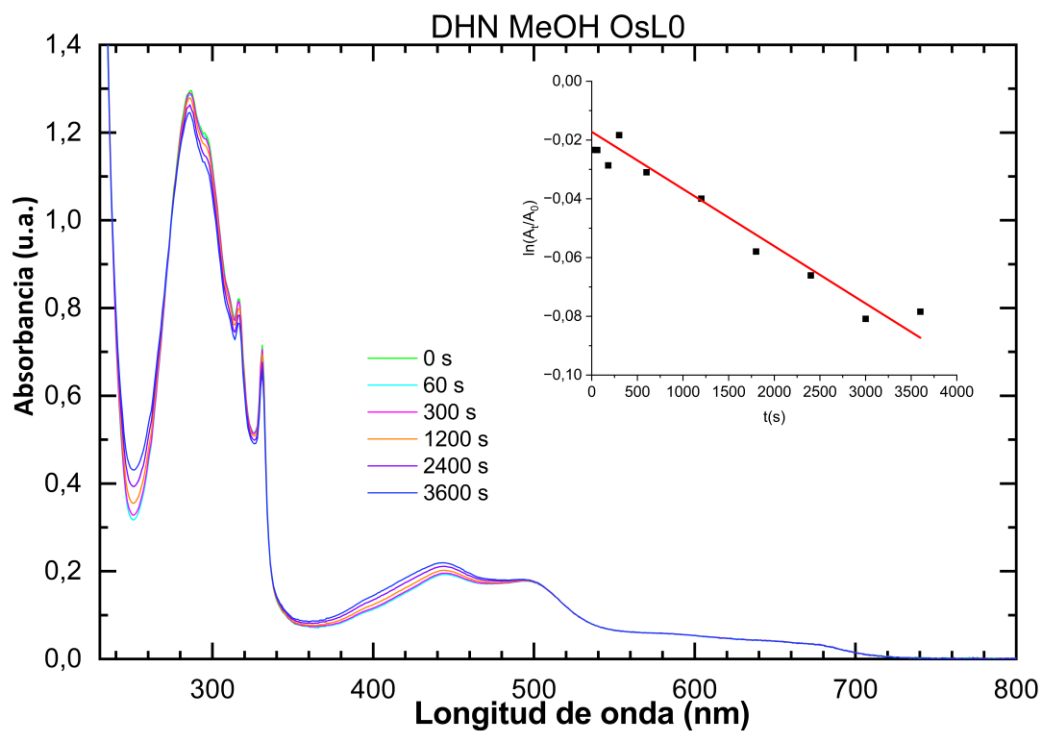
Anexo-Figura 29. Fotooxidación de DHN con OsL0 en acetonitrilo.



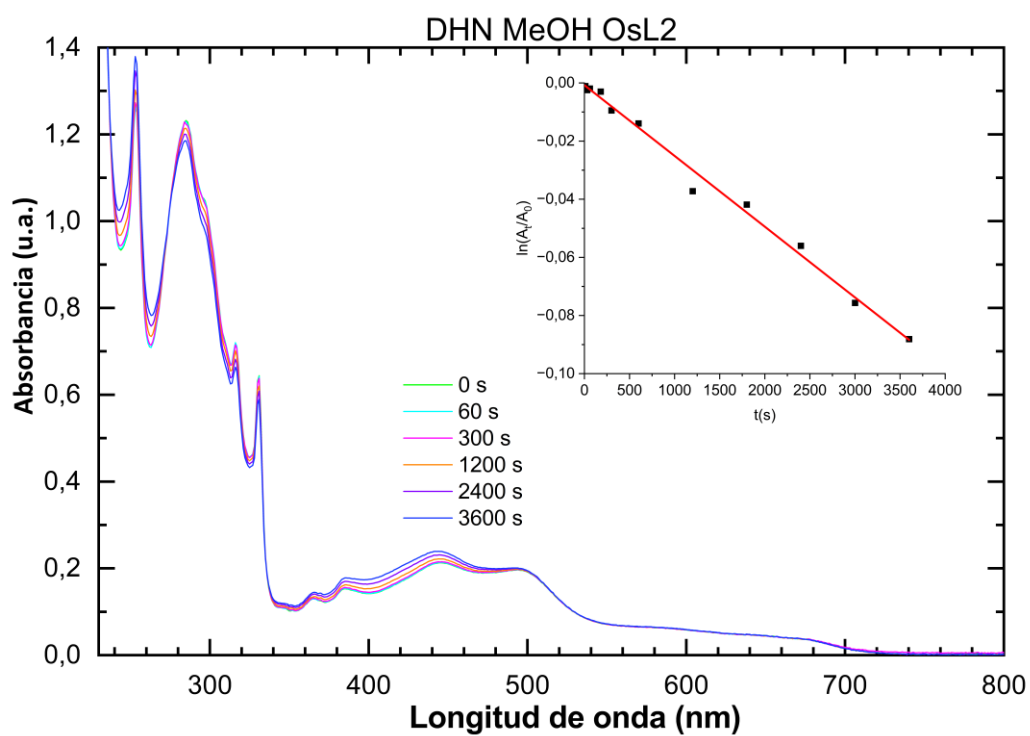
Anexo-Figura 30. Fotoxidación de DHN con OsL2 en acetonitrilo.



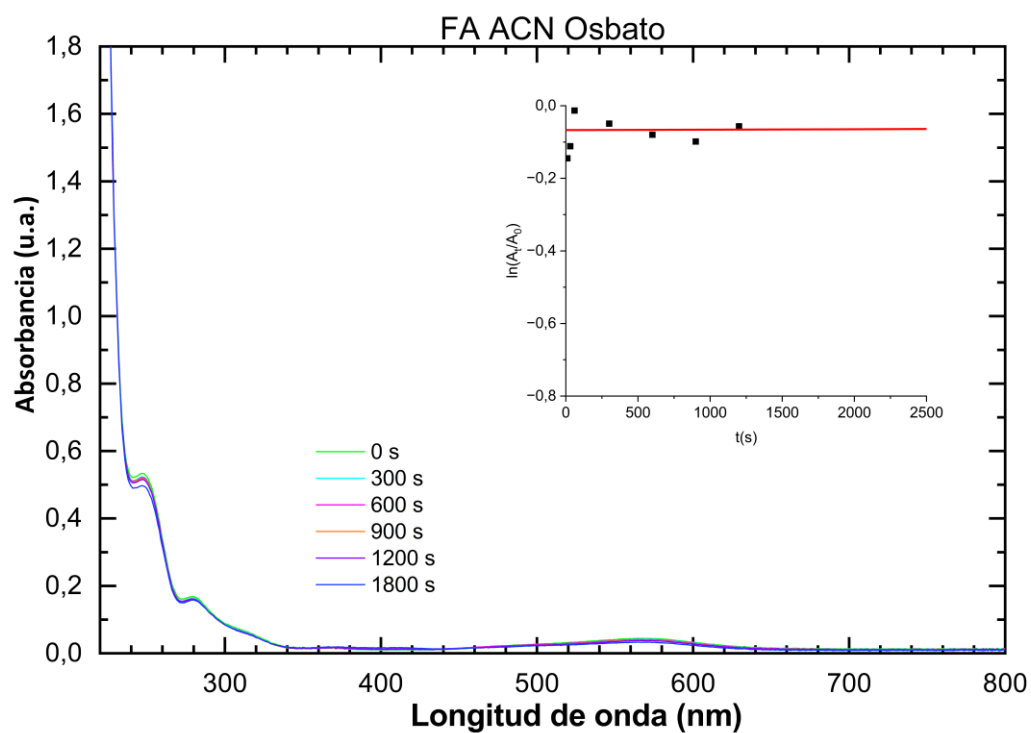
Anexo-Figura 31. Fotoxidación de DHN con Osbato en metanol.



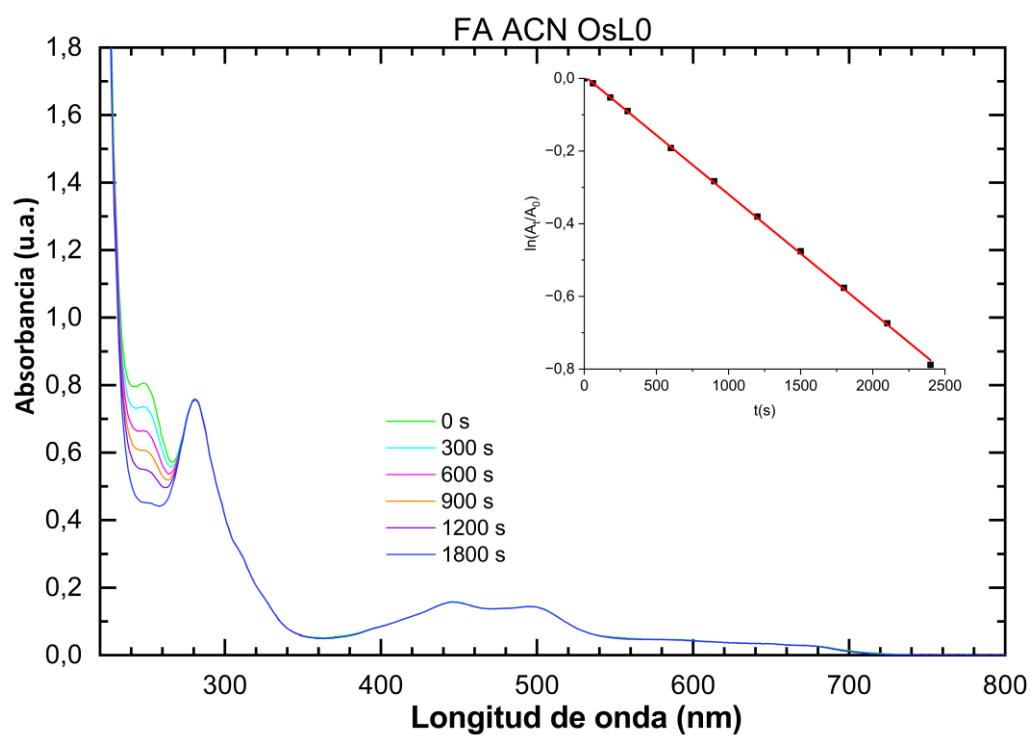
Anexo-Figura 32. Fotooxidación de DHN con OsL0 en metanol.



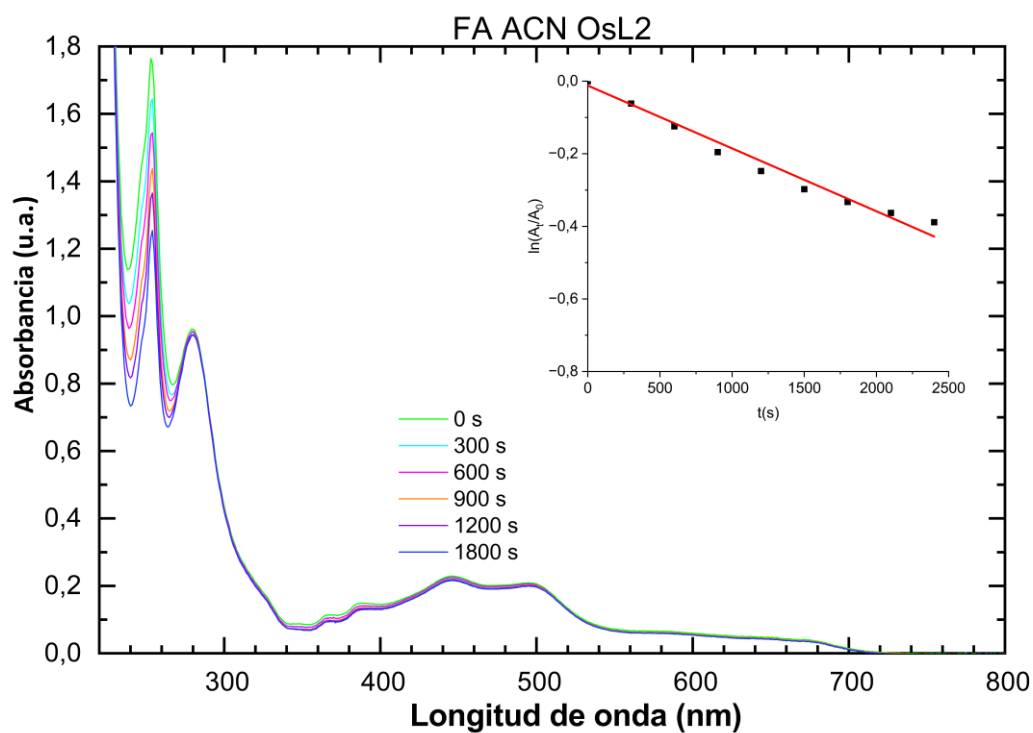
Anexo-Figura 33. Fotooxidación de DHN con OsL2 en metanol.



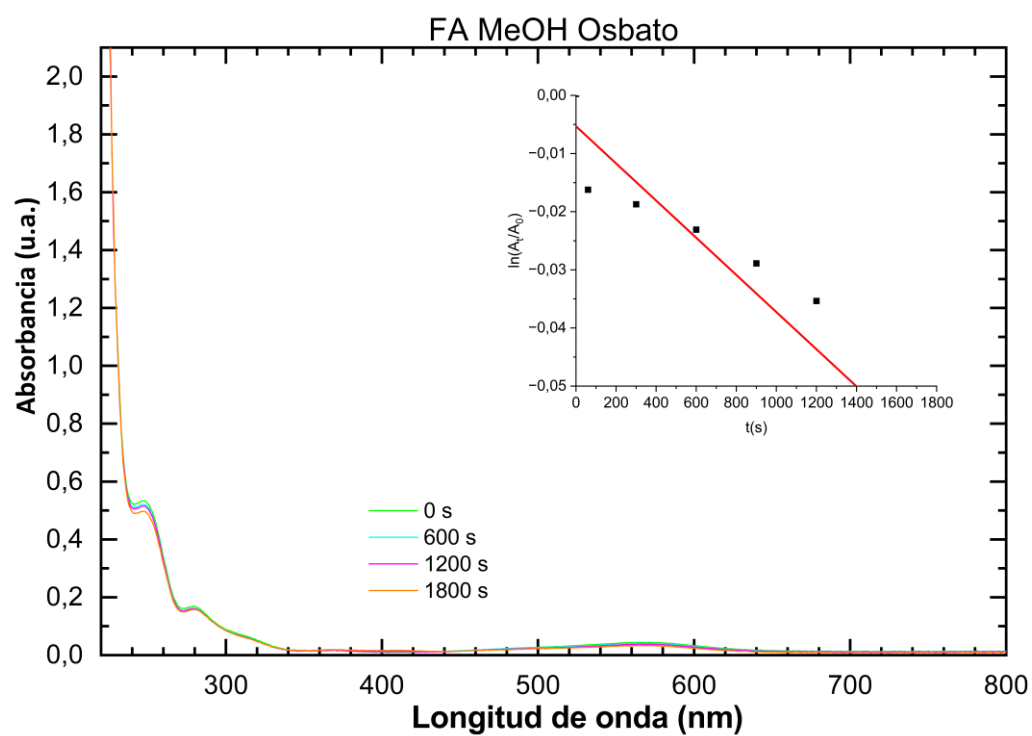
Anexo-Figura 34. Fotooxidación de FA con OsBato en acetonitrilo.



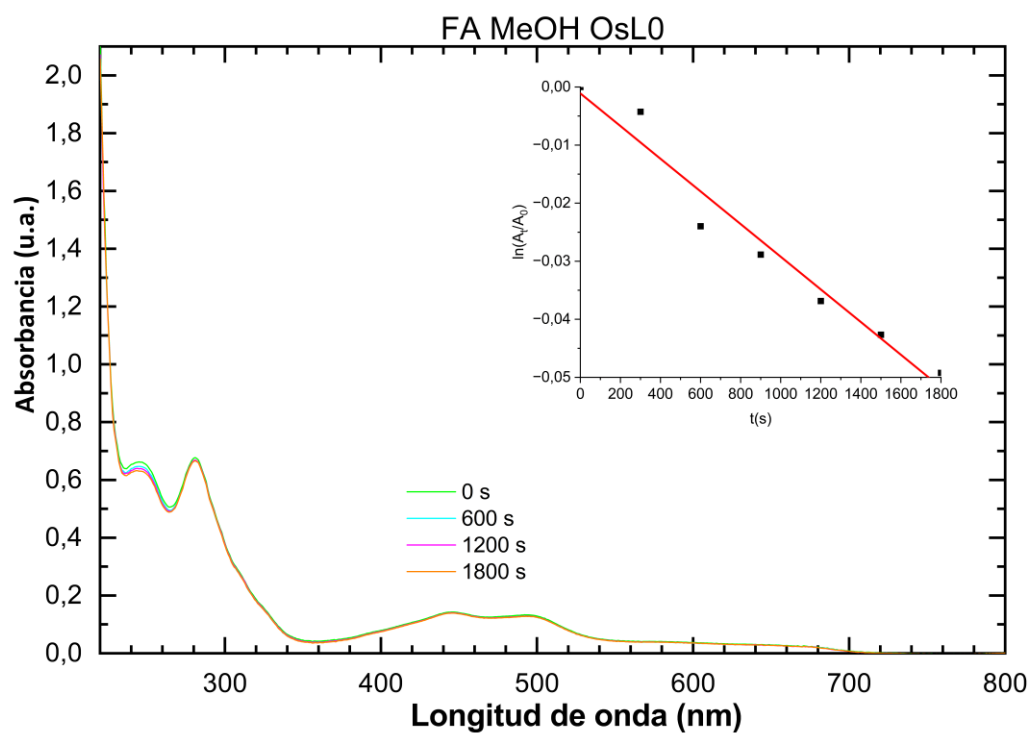
Anexo-Figura 35. Fotooxidación de FA con OsL0 en acetonitrilo.



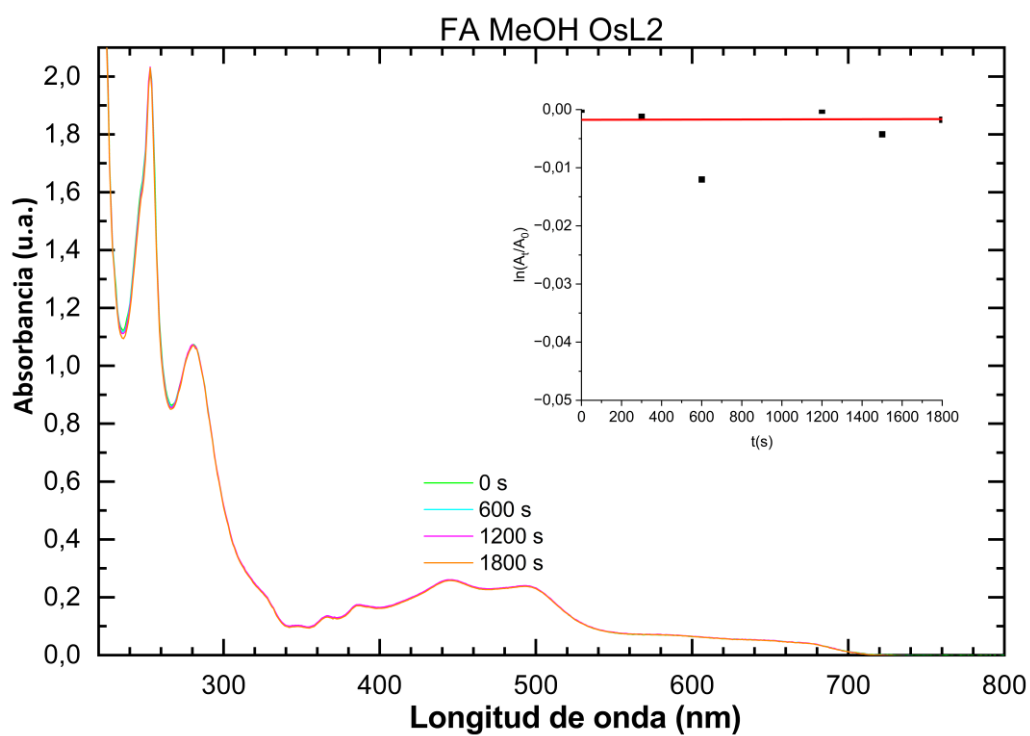
Anexo-Figura 36. Fotooxidación de FA con OsL2 en acetonitrilo.



Anexo-Figura 37. Fotooxidación de FA con Osbato en metanol.



Anexo-Figura 38. Fotoxidación de FA con OsL0 en metanol.



Anexo-Figura 39. Fotoxidación de FA con OsL2 en metanol.

Anexo – Valores parte económica

1. **Sueldo mensual técnico de laboratorio:** <https://tusalarario.org/chile/carrera/funcion-y-salario/tecnicos-de-laboratorios-medicos-o-patologicos>
2. **Balón de vidrio dos bocas:** <https://soviquim.cl/fabricacion-en-vidrio/264-balon-f-red-1000mL-2-bocas-ns24-40-ns-19-26.html>
3. **Vaso precipitado 100 mL:** https://soviquim.cl/vidrio-para-laboratorio/4777-1863-vaso-precip-forma-baja-simax.html#/385-capacidad_mL-100_mL
4. **Matraz Erlenmeyer:** www.vimaroni.cl
5. **Columna Cromatografía:** <https://soviquim.cl/fabricacion-en-vidrio/644-columna-cromatografia-llave-inferios-de-ptfe-sin-fritavolumen-125-mL-diametro-20-mm-largo-400-mm.html>
6. **Certificado de registro sanitario de producto farmacéutico con formula (Modelo OMS, bilingüe) :** <https://www.ispch.gob.cl/prestacion/4112106/>
7. **Patente INAPI (1 UTM = \$69.542 al 3 de diciembre de 2025) :**
https://www.inapi.cl/docs/default-source/2024/patentes/para-informarse/tabla_tasas_guia_practica_para_el_usuario_01_01_25.pdf?sfvrsn=ed61ee83_1
8. **Hexacloroosmato de amonio (IV):**
<https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/product/aldrich/209074?srsId=AfmBOoqHs4nAegse37AF3Vdc6WlUICGgtKX2oaBHNPE5YKGrkdHV6kih>
9. **Batofenantrolina:**
<https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/product/aldrich/133159?srsId=AfmBOoqH6bsFE0swTkmrne79xvU7B1keD9T6hiTu3Mw219yvtvNMsxZj9>
10. **Ditionito de sodio:**
https://quimicaindustrial.cl/producto/hidrosulfito-de-sodio/?srsId=AfmBOop9J5CYtKHsp6Xm3vo3M55PHp2NO31Elx0MhT7rmjciH_01Jxnm
11. **Pluronic F-127:**
https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/product/sigma/p2443?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=22179178721&utm_content=177793363361&gad_source=1&gad_campaignid=22179178721&gbraid=0AAAAAD8kLQS_LfOL7sV4Wx-plwYy_p4Fv&gclid=CjwKCAiA3L_JBhAlEiwAlcWO511x449U1ZXCI60VgZyIKSZrXIehZvk_sba9vaOMVYN0DHZX7igXa9RoCuRUQAvD_BwE
12. **Etilenglicol:**
https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/product/sigald/293237?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=22792002210&utm_content=183401906598&gad_source=1&gad_campaignid=22792002210&gbraid=0AAAAAD8kLQSN-mx2DrhuobMXhpUuxHqem&gclid=CjwKCAiA3L_JBhAlEiwAlcWO54sAqTP2eqtKCM9_u0eium6mVhXg9kqVsvN4xyh8JKHqFSS8mLrSB0CLioQAvD_BwE

13. **Éter:** <https://vimaroni.cl/producto/eter-etilico-anhidro-acs-reenv-tedia-1lt-ctrl/>

14. **Agua desionizada:**

https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/product/sigald/38796?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=22359487829&utm_content=171923992210&gad_source=1&gad_campaignid=22359487829&gbraid=0AAAAAD8kLQTuwoI5vzirjeAUuzLCNtk-W&gclid=CjwKCAiA3L_JBhAlEiwAlcWO55sfS36dMnbCbQbCG3aasUvSVLRiyJZ_wGos-OIUbHCVGKNG2zlp-xoCyfoQAvD_BwE

15. **Alumina:**

<https://productosquimicoschile.cl/productos/aluminio-hidroxido-alumina-65/?srsltid=AfmBOoqsGzGiLZxMHkbFQ8JKUHcSjqVYeKC-xO9u2S9LJZp5PHhRXeEq>

16. **Acetonitrilo:** <https://vimaroni.cl/producto/acetonitrilo-hplc-spectro-tedia-4-lt-as1122-001/>

17. **Tolueno:**

https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/product/sigald/179418?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=22792002210&utm_content=183401906598&gad_source=1&gad_campaignid=22792002210&gbraid=0AAAAAD8kLQSN-mx2DrhuobMXhpUuxHqem&gclid=CjwKCAiA3L_JBhAlEiwAlcWO50MNgsYaOnxoSAwfQUK_9C9qiQh8wZJHYlrpqhphphigzBmAC0wyhoChh4QAvD_BwE

18. **Diclorometano:** <https://vimaroni.cl>

19. **Kit de ensayo de crecimiento celular MTT:**

<https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/product/mm/ct02?srsltid=AfmBOorVAyarhzKAS5RtCajnfUzd0ov9mXziwTJ02l0Qd5bCaVD1UKA>

20. **Microscopía Confocal:** <https://www.uv.es/uvweb/servicio-central-soporte-investigacion-experimental/es/organizacion/ucim/secciones-ucim/microscopia/tarifas-1285876879607.html>



Anexo – Flujo de caja

Año	Unidades ventas	Ingresos	Costo variable	Costo fijo	Depreciación anual	Utilidad Operacional	Impuesto (27%)	Flujo neto	Flujo acumulado
0								\$ -19.032.626	\$ -19.032.626
1	12	\$42.771.591	\$30.551.137	\$ 2.166.737	\$167.769	\$9.885.949	\$2.669.206	\$ 7.384.512	\$ -11.648.114
2	13	\$47.048.751	\$33.606.250	\$ 2.166.737	\$167.769	\$11.107.994	\$2.999.158	\$ 8.276.605	\$ 15.661.117
3	15	\$51.753.626	\$36.966.875	\$ 2.166.737	\$167.769	\$12.452.244	\$3.362.106	\$ 9.257.908	\$ 17.534.513
4	16	\$56.928.988	\$40.663.563	\$ 2.166.737	\$167.769	\$13.930.919	\$3.761.348	\$ 10.337.340	\$ 19.595.248
5	18	\$62.621.887	\$44.729.919	\$ 2.166.737	\$167.769	\$15.557.462	\$4.200.515	\$ 11.524.716	\$ 21.862.057
6	19	\$68.884.076	\$49.202.911	\$ 2.166.737	\$167.769	\$17.346.659	\$4.683.598	\$ 12.830.830	\$ 24.355.546
7	21	\$75.772.483	\$54.123.202	\$ 2.166.737	\$167.769	\$19.314.775	\$5.214.989	\$ 14.267.555	\$ 27.098.385
8	23	\$83.349.731	\$59.535.522	\$ 2.166.737	\$167.769	\$21.479.703	\$5.799.520	\$ 15.847.952	\$ 30.115.507
9	26	\$91.684.705	\$65.489.075	\$ 2.166.737	\$167.769	\$ 23.861.124	\$6.442.504	\$ 17.586.390	\$ 33.434.342
10	28	\$100.853.175	\$72.037.982	\$ 2.166.737	\$167.769	\$26.480.687	\$7.149.786	\$ 19.498.671	\$ 37.085.060
11	31	\$110.938.493	\$79.241.780	\$ 2.166.737	\$167.769	\$29.362.206	\$7.927.796	\$ 21.602.180	\$ 41.100.850
12	34	\$122.032.342	\$87.165.958	\$ 2.166.737	\$167.769	\$32.531.878	\$8.783.607	\$ 23.916.040	\$ 45.518.220
13	38	\$134.235.576	\$95.882.554	\$ 2.166.737	\$167.769	\$36.018.516	\$9.724.999	\$ 26.461.286	\$ 50.377.326
14	41	\$147.659.134	\$105.470.810	\$ 2.166.737	\$167.769	\$39.853.818	\$10.760.531	\$ 29.261.056	\$ 55.722.342
15	46	\$162.425.047	\$116.017.891	\$ 2.166.737	\$167.769	\$44.072.651	\$11.899.616	\$ 32.340.804	\$ 61.601.860
16	50	\$178.667.552	\$127.619.680	\$ 2.166.737	\$167.769	\$48.713.366	\$13.152.609	\$ 35.728.526	\$ 68.069.330
17	55	\$196.534.307	\$140.381.648	\$ 2.166.737	\$167.769	\$53.818.153	\$14.530.901	\$ 39.455.021	\$ 75.183.547
18	61	\$216.187.738	\$154.419.813	\$ 2.166.737	\$167.769	\$59.433.419	\$16.047.023	\$ 43.554.165	\$ 83.009.186
19	67	\$237.806.511	\$169.861.794	\$ 2.166.737	\$167.769	\$65.610.212	\$17.714.757	\$ 48.063.224	\$ 91.617.389
20	73	\$261.587.163	\$186.847.973	\$ 2.166.737	\$167.769	\$72.404.684	\$19.549.265	\$ 53.023.188	\$ 101.086.412