

# CARACTERIZACIÓN DE UNA PELÍCULA DE QUITOSANO CONTENIENDO FTALOCIANINA DE ALUMINIO TETRASULFONADA CLORADA (ALPcS<sub>4</sub>Cl) Y SU INTERACCIÓN CON LA PIEL

Mitzy Cerna Alzamora<sup>a</sup>, Nancy Rojas Morán<sup>b</sup>, Julio Santiago Contreras<sup>a\*</sup>

## RESUMEN

La terapia fotodinámica es un tratamiento utilizado para destruir células no deseadas (cáncer, psoriasis, acné, lunares, etc.). Consiste en generar oxígeno singlete en las zonas afectadas, conjugando la acción de un fotosensibilizador, luz y oxígeno molecular, para provocar la muerte celular. En este trabajo se inmoviliza un fotosensibilizador, el AlPcS<sub>4</sub>Cl, en una película de quitosano y se trata de identificar si se transfiere a la piel cuando se pone en contacto con ella. La eficiencia del fotosensibilizador es estudiada indirectamente, viendo su efecto frente al ácido úsnico. La película quitosano-AlPcS<sub>4</sub>Cl es caracterizada por espectroscopía UV-Visible y fluorescencia. La potencial acumulación del fotosensibilizador en la piel se estudió por MALDI-TOF-MS sobre biopsias de piel. Se observó que el AlPcS<sub>4</sub>Cl sí provoca cambios estructurales en el ácido úsnico. No se detectaron trazas de fotosensibilizador en la piel de ratón cuando esta estuvo en contacto con películas de quitosano-AlPcS<sub>4</sub>Cl, pero sí cuando se inoculó directamente el fotosensibilizador en la piel de ratón.

**Palabras clave:** AlPcS<sub>4</sub>Cl, Encapsulamiento de fotosensibilizador, MALDI-TOF-MS, Espectroscopia de fluorescencia.

## CHARACTERIZATION OF A CHITOSAN FILM CONTAINING ALUMINUM PHTHALOCYANINE TETRASULFONATE CHLORIDE (ALS<sub>4</sub>PC-CL) AND ITS INTERACTION WITH THE SKIN

## ABSTRACT

Photodynamic therapy is a treatment used to destroy unwanted cells (cancer, psoriasis, acne, moles, etc.). It involves generating singlet oxygen in the affected areas, combining the action of a photosensitizer, light, and molecular oxygen, to cause cell death. In this study, a photosensitizer, AlPcS<sub>4</sub>Cl, is immobilized in a chitosan film and an attempt is made to determine whether it transfers to the skin upon contact. The efficiency of the photosensitizer is studied by observing its effect on usnic acid. The chitosan-AlPcS<sub>4</sub>Cl film was characterized by UV-visible and fluorescence spectroscopic analyses. The potential accumulation of the photosensitizer in skin was evaluated using MALDI-TOF-

<sup>a</sup> Facultad de Química e Ing. Química, Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Química Orgánica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú. \*jsantiagoc@unmsm.edu.pe

<sup>b</sup> Facultad de Medicina Humana, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.

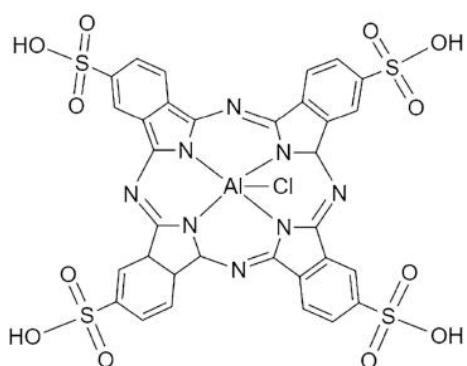
MS analysis of skin biopsies. It was observed that AlPcS<sub>4</sub>Cl does cause structural changes in usnic acid. No traces of photosensitizer were detected on mouse skin when it was in contact with chitosan-AlPcS<sub>4</sub>Cl films, but they were detected when the photosensitizer was directly inoculated into the mouse skin.

**Keywords:** AlPcS<sub>4</sub>Cl, Photosensitizer encapsulation, MALDI-TOF-MS, Fluorescence spectroscopy.

## INTRODUCCIÓN

La terapia fotodinámica (TFD) es una modalidad de tratamiento que ha sido utilizada en el tratamiento exitoso de una serie de enfermedades y trastornos, incluidas la degeneración macular relacionada con la edad, la psoriasis y ciertos cánceres<sup>1</sup>. El proceso fotodinámico combina tres componentes (un fotosensibilizador (FS), luz y oxígeno molecular) para eliminar patógenos, células o tejidos. Los tres componentes no son tóxicos cuando actúan por separado<sup>2</sup>. Cuando el fotosensibilizador es irradiado con luz de longitud de onda apropiada, absorbe energía y la transfiere al oxígeno molecular, convirtiéndola en oxígeno singlete, una especie muy reactiva. Esta última especie es la responsable de provocar una serie de reacciones sobre biomoléculas importantes, provocando muerte celular o del microorganismo en donde se está provocando el proceso fotodinámico<sup>1</sup>. Este proceso fue aplicado inicialmente en la FTD del cáncer a la piel, pero en la actualidad se aplica en el tratamiento de diversas enfermedades o desórdenes de la piel. La TFD es doblemente selectiva, ya que el FS se acumula selectivamente en las células cancerosas y, además, el proceso se inicia solamente con la iluminación de la zona afectada<sup>2,3</sup>. En el caso de tratamiento de desórdenes de la piel (psoriasis, acné, queratosis actínica, leishmania cutánea, etc.) se utiliza el FS incorporado en cremas, las que se aplican tópicamente. El FS es absorbido por la piel y, al ser irradiado con luz visible, se inicia el proceso fotodinámico y las células superficiales de la piel son eliminadas<sup>4,5</sup>.

El AlPcS<sub>4</sub>Cl es un fotosensibilizador hidrofílico constituido por un anillo de ftalocianina rodeado de cuatro grupos sulfónicos, con un átomo de aluminio en la cavidad central, unido a un átomo de cloro, Figura 1. Este fotosensibilizador ha sido muy estudiado por su alta afinidad por ciertos tipos de cáncer (cáncer de vesícula) y por su rápida eliminación del organismo. El AlPcS<sub>4</sub>Cl ha sido ensayado para controlar amastigotes de *Leishmania (V.) peruviana*, lográndose una inhibición del 72%<sup>6</sup>.



**Figura 1.** Estructura química del AlPcS<sub>4</sub>Cl

En general, la investigación actual sobre la TFD se basa en cuatro aspectos fundamentales:

- a) *Tipo de fotosensibilizador*: Los FS utilizados en la TFD son generalmente derivados de porfirina y ftalocianina, y pueden ser hidrofílicos o lipofílicos<sup>7</sup>.
  - b) *Localización intracelular*: El daño celular provocado por el FS, y por ende el tipo de muerte celular, depende de la zona en la célula donde se acumula el fotosensibilizador. El grado de lipofilicidad de los fotosensibilizadores determina su localización y el tipo de daño celular. En general, un fotosensibilizador lipofílico se acumula en la membrana de la célula y sus organelas<sup>7</sup>. De otro lado, los fotosensibilizadores hidrofílicos ingresan a la célula por pinocitosis y son localizados principalmente en lisosomas y endosomas<sup>8</sup>. También se utiliza el ácido aminolevulínico (ALA), un precursor para la biosíntesis de porfirina en el organismo<sup>9</sup>. Ya existen tres generaciones de fotosensibilizadores y algunos de ellos ya se encuentran autorizados por la FDA para su comercialización<sup>1</sup>. El FS ideal debe tener una gran afinidad por las células cancerosas (o las que se quieran eliminar), debe metabolizarse rápidamente de las células normales, poseer una fuerte absorción y un alto rendimiento cuántico para generar oxígeno singlete<sup>1,2</sup>. Por ejemplo, los FS lipofílicos se acumulan en la membrana celular, provocando la desintegración de la membrana celular<sup>1</sup>. Un FS a base de tetrafenilporfirina rodeado de cuatro cadenas largas de doce átomos de carbono, lo que le confiere una alta lipofilicidad, se acumula en la membrana celular (modificando la permeabilidad de los canales iónicos) y en la cromatina<sup>10,11</sup>.
  - c) *Nuevos vehículos portadores del fotosensibilizador*: Se han desarrollado diferentes estrategias para mejorar la internalización del FS al interior de la célula que se quiere eliminar. Por ejemplo, los FS hidrofílicos, como el AlPcS<sub>4</sub>Cl, se pueden conjugar con péptidos, con liposomas y con nanopartículas inorgánicas para mejorar su penetrabilidad en las células<sup>12</sup>. Para aplicaciones no cancerosas, los FS se aplican en forma de cremas<sup>13</sup>. También se ha intentado inmovilizar fotosensibilizadores (ZnPcS<sub>4</sub>) en membranas de quitosano y se demostró que el fotosensibilizador mantenía sus propiedades de generar oxígeno singlete<sup>14,15</sup>.
  - d) *Nuevas fuentes de luz y técnicas de monitoreo*: Al inicio de la TFD, la fuente de luz fue el láser, pero los FS también pueden ser activados con luz visible proveniente de LEDs con diferentes longitudes de onda<sup>6,16</sup>. De otro lado, las técnicas de monitoreo de la TFD aprovechan la fluorescencia de los FS que han sido absorbidos en los tejidos<sup>17</sup>. Recientemente se ha combinado la Tomografía de Emisión de Positrones (PET) para visualizar la acción del fotosensibilizador AlPcS<sub>4</sub>Cl<sup>18</sup>.
- Cuando se aplica la TFD *in vivo*, generalmente se da un tiempo de 24 h para que el fotosensibilizador se distribuya en el organismo, y luego se aplica la fuente de luz en la zona donde se quiere generar el oxígeno singlete<sup>1</sup>. En este artículo se utilizó el AlPcS<sub>4</sub>Cl en solución y dentro de una película de quitosano, y se puso en contacto con piel de ratón, para luego tratar de identificar la presencia del fotosensibilizador y su tiempo de permanencia en la piel. Para ello se aplica la técnica de MALDI-MS sobre una biopsia de piel. Previamente, se estudió la actividad del fotosensibilizador sobre una solución de ácido úsnico, una molécula fotoprotectora bastante estable.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiales

El fotosensibilizador AlPcS<sub>4</sub>Cl (Peso molecular 895,25 g/mol) se obtuvo de Frontier Scientific (USA). El quitosano, de viscosidad 400 mPa.s., ácido acético glacial, etanol y ácido úsnico provinieron de Merck.

### Estudio de la interacción del ácido úsnico con AlPcS<sub>4</sub>Cl

Se preparó una solución del fotosensibilizador AlPcS<sub>4</sub>Cl  $4,7 \times 10^{-4}$  M (0,0042 g de AlPcS<sub>4</sub>Cl en 10 mL de agua destilada). Se tomó 5,4 mL del fotosensibilizador y se enrasó en una fiola de 25 mL con una solución de 0,0025 g de ácido úsnico en etanol. Se obtuvo una solución con 100 ppm de ácido úsnico y AlPcS<sub>4</sub>Cl  $1,02 \times 10^{-4}$  M (Solución 1).

Se tomó 2,5 mL de la solución 1 y se enrasó con etanol 78% en una fiola de 25 mL, obteniéndose una solución de ácido úsnico 10 ppm y AlPcS<sub>4</sub>Cl  $1,02 \times 10^{-5}$  M (Solución 2).

Se colocaron 5 mL de la solución 2 en 4 diferentes viales, los cuales fueron llevados a la cámara para ser irradiados con luz roja LED ( $\lambda=670$  nm) por diferentes tiempos (20, 22, 24 y 48 h, respectivamente). Los cambios fueron monitoreados por espectroscopía UV-visible.

### Preparación de películas de Quitosano-AlPcS<sub>4</sub>Cl a diferentes concentraciones

Se preparó una solución del fotosensibilizador AlPcS<sub>4</sub>Cl  $5,0 \times 10^{-4}$  M (0,0045 g AlPcS<sub>4</sub>Cl/10 mL de agua destilada), a partir de la cual se preparó una solución de concentración  $5,0 \times 10^{-5}$  M. A partir de esta nueva solución se realizaron diluciones de 1,0; 2,0; 3,0 y  $4,0 \times 10^{-5}$  M.

De otro lado, se preparó una solución de quitosano al 1% en CH<sub>3</sub>COOH al 1%. Finalmente, se prepararon mezclas de solución de quitosano y del fotosensibilizador a diferentes concentraciones (2:1, 20 mL), respectivamente, y se trasvasaron a placas Petri, y se secaron en estufa a 40 °C por 24 h.

### Caracterización de las películas de quitosano-AlPcS<sub>4</sub>Cl

Las películas obtenidas fueron caracterizadas por espectroscopía UV-visible (Thermo Scientific, Heños γ, simple haz, precisión 1 nm, barrido de 200 a 800 nm) y fluorescencia (Exemplar BWTek, Delaware, US, con una fuente de excitación de 405 nm, con una integración de 50 ms).

### Interacción de películas de quitosano-AlPcS<sub>4</sub>Cl con piel de ratón

Películas de Quitosano-AlPcS<sub>4</sub>Cl (la concentración del AlPcS<sub>4</sub>Cl utilizada fue  $4,0 \times 10^{-5}$  M), de dimensiones 1 x 1 cm, se pusieron en contacto con el lomo rasurado de un ratón. Luego de 24 h se sacrificó al ratón, se tomó una biopsia de la zona de contacto, se colocó en formol para su preservación y se procedió a realizar la determinación de la presencia de AlPcS<sub>4</sub>Cl mediante el MALDI-TOF-MS (Thermo Q Exactive HF).

### Obtención de pieles de ratón inyectadas con AlPcS<sub>4</sub>Cl

Se preparó una solución del fotosensibilizador AlPcS<sub>4</sub>Cl  $4,7 \times 10^{-4}$  M (0,0042 g AlPcS<sub>4</sub>Cl/10 mL de agua destilada). Se inyectó 0,075 mL del fotosensibilizador por inyección subcutánea al ratón de aprox. 30g, según el siguiente cálculo:

$$V_{\text{inyect.}}(\text{mL}) = (1 \text{ mg FS/kg}) \times (1 \text{ mL}/0.42 \text{ mg FS}) \times (W_{\text{ratón}} \text{ (kg)})$$

Donde: FS se refiere al fotosensibilizador AlPcS<sub>4</sub>Cl.

Luego de aproximadamente 10 min, se procedió a sacrificar al ratón y realizar el corte de la piel donde se realizó la inyección. Finalmente, las muestras de pieles se colocaron en formol para su preservación y se procedió a realizar la determinación de la presencia de AlPcS<sub>4</sub>Cl mediante el MALDI-MS (Thermo Q Exactive HF).

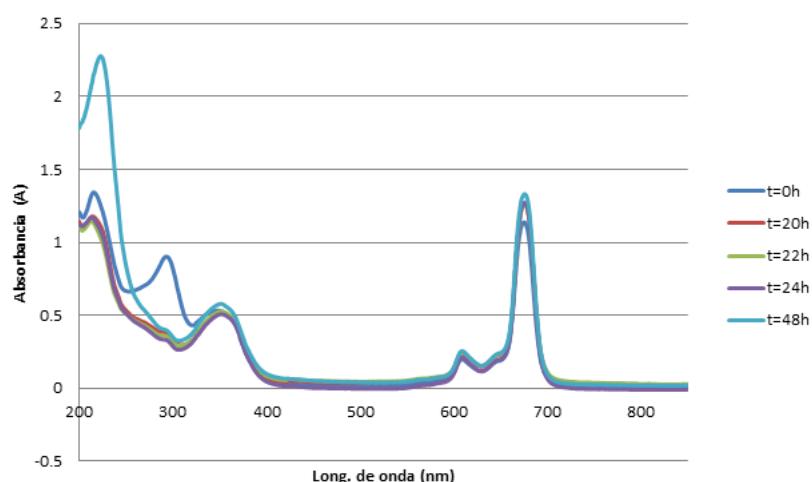
### Análisis de las biopsias por MALDI-MS

Para la lectura en el equipo se utilizó la matriz  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid ( $\alpha$ -CHCA) disuelta en acetonitrilo/ácido trifluoroacético 0,1% - MeOH (1:1) con concentración de 20 mg/mL, la cual fue aplicada mediante spray sobre la muestra y fue leída con polaridad positiva en el rango de 200 - 2000 m/z con aceleración de voltaje de 3,0 kV y resolución de 30 000. Nivel RF de lente S: 70. Temperatura del capilar: 300 °C<sup>19</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Estudio de la interacción del ácido úsnico con AlPcS<sub>4</sub>Cl

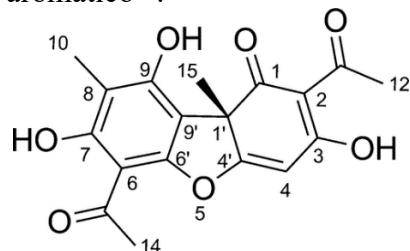
La Figura 2 muestra la evolución de los espectros UV-Visible de una solución de ácido úsnico 10 ppm y AlPcS<sub>4</sub>Cl  $1,02 \times 10^{-5}$  M, colocados en una cámara e irradiados con luz roja LED ( $\lambda=670$  nm) por diferentes tiempos (20, 22, 24 y 48 h). Al tiempo t=0, se observan las bandas de absorción del FS a 675 nm, 608 nm y 350 nm<sup>20</sup>, y las bandas de absorción del ácido úsnico a 234 y 282 nm<sup>17</sup>. Se seleccionó utilizar una luz LED roja, de 670 nm, para poder excitar la banda más intensa del FS, y así generar oxígeno singlete<sup>6</sup>.



**Figura 2.** Espectros de absorción de solución de ácido úsnico 10 ppm/AlPcS<sub>4</sub>Cl  $1,0 \times 10^{-5}$  M. Se observa la desaparición de la banda a 282 nm del ácido úsnico.

Con el tiempo de irradiación se observa que la banda del ácido úsnico a 282 nm desaparece. A 20 h de irradiación ya no se observa dicha banda. En cambio, la otra banda del ácido úsnico, a 232 nm, prácticamente no cambió de intensidad. La curva obtenida a 48 h está amplificada debido a una disminución del volumen (incremento de concentración), sin embargo, permite ver mejor la desaparición de la banda a 282 nm. Hay que remarcar que de las dos bandas del ácido úsnico, se ha reportado que la posición de la banda a 232 nm depende del solvente utilizado<sup>21</sup>.

Se ha reportado que el ácido úsnico no genera oxígeno singlete ni tampoco actúa como atenuador, es decir, que tampoco reacciona con el oxígeno singlete<sup>22</sup>. Sin embargo, los espectros UV muestran que el ácido úsnico sufre variaciones estructurales en presencia del AlPcS<sub>4</sub>Cl, en las condiciones del experimento, en función del tiempo. Se sabe que el oxígeno singlete reacciona principalmente con los dobles enlaces a través de reacciones de adición electrofílica o reacciones de tipo ene. Según la estructura del ácido úsnico (Figura 3), lo más probable es que reacciones con los dobles enlaces de las posiciones 2 o 4, ya que este anillo no es aromático<sup>23</sup>.



**Figura 3.** Estructura química del ácido úsnico

### Caracterización de películas de Quitosano-AlPcS<sub>4</sub>Cl

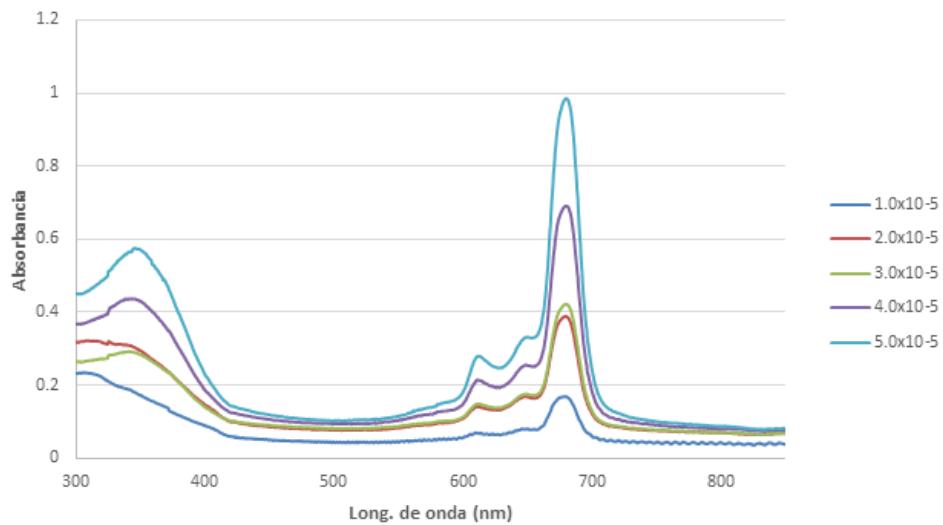
Luego de la evaporación del solvente, de las mezclas de soluciones de quitosano y FS descritas en la parte experimental, quedaron películas en las placas Petri. El color turquesa de las mismas se muestra cada vez más intenso en función del incremento de la concentración utilizada del FS. Se cortaron láminas rectangulares (1 x 4 cm) (Figura 4) y fueron adaptadas para ser medidas directamente en los espectrofotómetros UV-Visible y de fluorescencia.



**Figura 4.** Películas de quitosano-AlPcS<sub>4</sub>Cl a diferentes concentraciones. El color se incrementa con la concentración del FS.

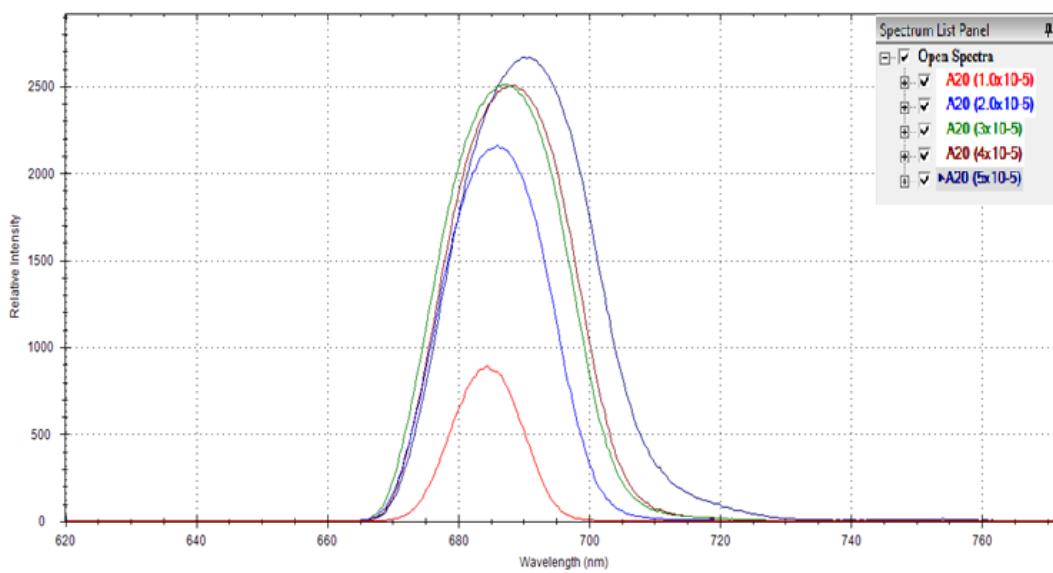
En la Figura 5, se observa el incremento de la intensidad de banda del fotosensibilizador en función de la concentración del mismo, utilizado para la preparación de las películas. La otra banda, a 350 nm, corresponde al quitosano. A pesar de que la medición de la absorbancia fue en estado sólido, las bandas del AlPcS<sub>4</sub>Cl aparecen en las mismas longitudes de onda

que cuando se mide en solución acuosa. La banda de absorción más intensa del AlPcS<sub>4</sub>Cl aparece a 675 nm<sup>24</sup>.



**Figura 5.** Espectros de absorción de películas de Quitosano-AlPcS<sub>4</sub>Cl a diferentes concentraciones.

Los espectros de fluorescencia de las películas de quitosano-AlPcS<sub>4</sub>Cl se muestran en la Figura 6. Se observa el característico desplazamiento Stokes, diferencia entre el  $\lambda_{\text{max}}$  en el espectro de absorción (675 nm) y el de la fluorescencia (682 nm). El  $\lambda_{\text{max}}$  de fluorescencia se incrementa con la concentración del FS, según lo observado en la literatura<sup>24</sup>. En este trabajo, a pesar de que se midió al estado sólido, el  $\lambda_{\text{max}}$  de fluorescencia siguió la misma tendencia, varía desde 682 nm ( $1 \times 10^{-5}$  M) hasta 686 nm ( $5 \times 10^{-5}$  M).

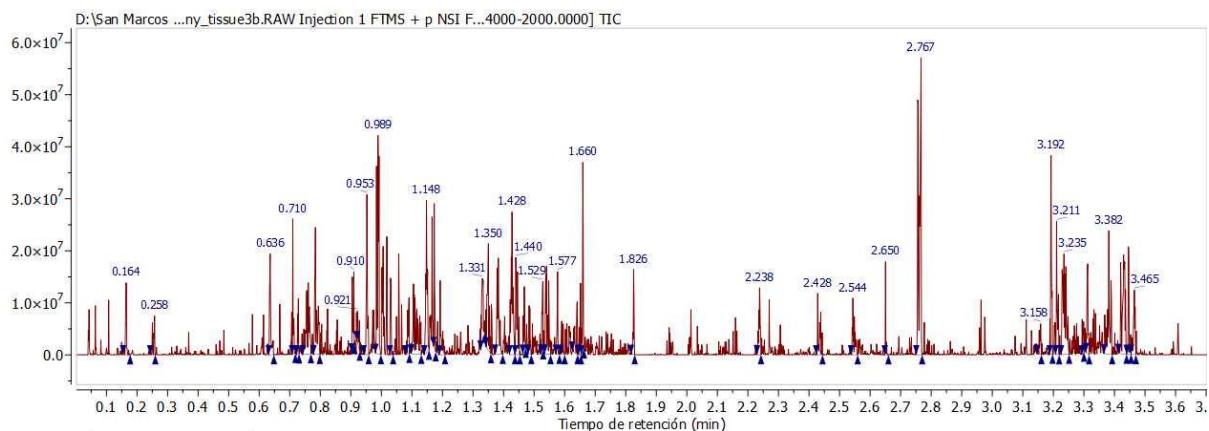


**Figura 6.** Espectros de emisión de películas de quitosano-AlPcS<sub>4</sub>Cl a diferentes concentraciones.

### Detección de AlPcS<sub>4</sub>Cl en piel de ratón

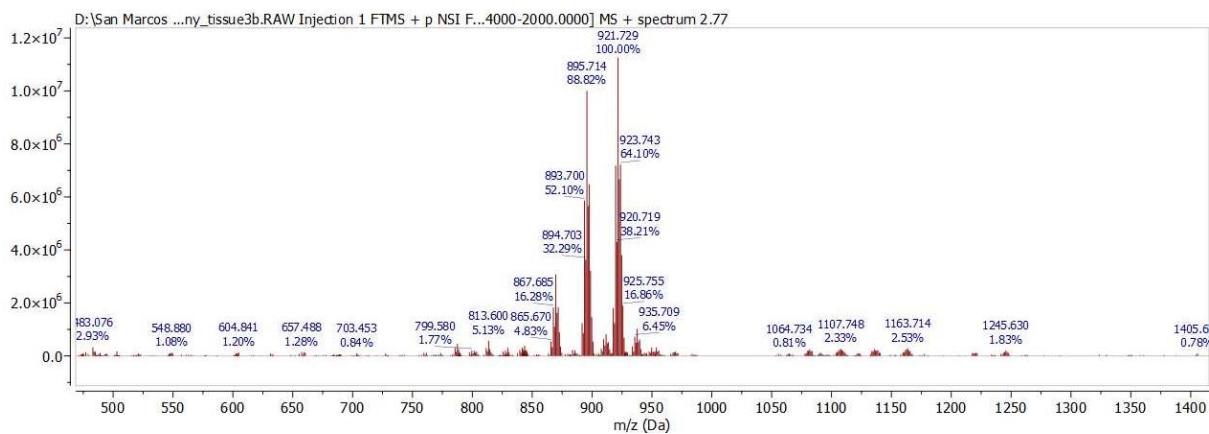
El análisis por MALDI-MS de biopsias de piel de ratón, que estuvieron en contacto con películas de quitosano-AlPcS<sub>4</sub>Cl, no detectó ninguna evidencia de presencia del FS.

Aparentemente, no hubo ninguna transferencia del fotosensibilizador a la piel por simple contacto entre ellos. En cambio, cuando se inyectó directamente una solución del FS, se llegó a detectar la señal del FS, pero se detectó solamente a partir de  $4,7 \times 10^{-4}$  M. Se podría pensar que el AlPcS<sub>4</sub>Cl podría haber salido de las biopsias cuando se dejaron en contacto con formol, pero estas soluciones se mantuvieron incoloras durante todo el tiempo que estuvieron en contacto con las biopsias.



**Figura 7.** Cromatograma obtenido por MALDI-TOF de la biopsia de piel de ratón.

La Figura 7 muestra el cromatograma obtenido por MALDI-TOF. Se observa un gran número de picos debido al gran número de biomoléculas presentes en la piel analizada. La señal del FS fue encontrada en la fracción a un tiempo de retención de 2,77 minutos. La Figura 8 muestra el grupo de señales característico del MALDI-MS. Se observa la señal del peso molecular del fotosensibilizador a 895,714 (Peso molecular del FS = 895,25 g/mol). Esta señal se obtuvo cuando se inoculó una solución de  $4,7 \times 10^{-4}$  M de AlPcS<sub>4</sub>Cl. Desafortunadamente, esta concentración ya es considerada tóxica. En el caso de soluciones más diluidas del fotosensibilizador, cabe la posibilidad de que el tiempo de espera de 10 minutos, para la obtención de las biopsias, haya sido suficiente para que el AlPcS<sub>4</sub>Cl se haya distribuido por el organismo del ratón, de tal manera que la concentración remanente del mismo sea suficientemente diluida para no ser detectado por MALDI-MS.



**Figura 8.** Espectro MALDI-MS de la fracción presente a 2,77 minutos. Se identifica la señal del fotosensibilizador a 895,714.

## CONCLUSIONES

Se obtuvo evidencia por espectroscopía UV de que el fotosensibilizador AlPcS<sub>4</sub>Cl es capaz de modificar estructuralmente al ácido úsnico. Las espectroscopías UV-Visible y de fluorescencia son apropiadas para caracterizar al fotosensibilizador AlPcS<sub>4</sub>Cl en el interior de películas de quitosano. Se observaron las mismas señales a las mismas longitudes de onda que en solución.

La técnica MALDI-TOF-MS es apropiada para detectar moléculas presentes en la piel, lo que abre diferentes posibilidades de estudiar la permanencia o la cinética de degradación de diferentes fármacos. En este estudio no se detectó ninguna traza del FS cuando películas de quitosano-AlPcS<sub>4</sub>Cl estuvieron en contacto con la piel, pero sí cuando se inoculó directamente el FS. El AlPcS<sub>4</sub>Cl fue detectado a partir de una concentración de  $4,7 \times 10^{-4}$  M.

## AGRADECIMIENTO

A los Drs. Alfredo Ibáñez y Fanny Casado, del Instituto de Ciencias Ómicas y Biotecnología Aplicada, ICOBA-PUCP, por la realización de los análisis por MALDI-TOF.

Esta investigación fue financiada por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, RR Nº 03202-R-18, Proyecto C18070391.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Correia, J.H.; Rodrigues, J.A.; Pimenta, S.; Dong, T.; Yang, Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics* 2021, 13, 1332. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091332>
2. Bonnett R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy, *Chem. Soc. Rev.* 1995; 24, 19–33.
3. Whitacre C, Feyes D, Satoh T, Grossmann J, Mulvihill J, Mukhtar H, Oleinick N. Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer PcS4 of SW480 human colon cancer xenografts in athymic mice, *Clin. Cancer Res.* 2000; 6, 2021–2027.
4. Gilaberte Y, Serra C, de las Heras M, Ruiz R, Fernández M, Benvenuto C, González S, Guillén C. Terapia fotodinámica en dermatología, *Actas Dermosifiliogr.* 2006; 97(2): 83-102.
5. Wan M, Lin J. Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology, *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* 2014; 7, 145–163.
6. Izarra-Rojas KV, Rojas-Palomino N, Gonzales-Medrano JL, Minaya-Gómez G, Berrocal-Huallpa A, Santiago-Contreras J, León J. In vitro inhibitory effect of aluminum phthalocyanine tetrasulfonate chloride against *Leishmania* (*Viannia*) *peruviana* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica.* 2020; 37(3), 462-70. Malacarne, M.C., Banfi, S., Rugiero, M. et al. Drug delivery systems for the photodynamic application of two photosensitizers belonging to the porphyrin family. *Photochem Photobiol Sci* 20, 1011–1025 (2021).

7. Kanai M, Obana A, Gohto Y, Nagata S, Miki T, Kaneda K, Nakajima S. Long-term effectiveness of photodynamic therapy by using a hydrophilic photosensitizer ATX-S10(Na) against experimental choroidal neovascularization in rats. *Lasers Surg Med.* 2000;26(1):48-57.
8. Wachowska M, Muchowicz A, Firczuk M, Gabrysiak M, Winiarska M, Wańczyk M, Bojarczuk K, Golab J. Aminolevulinic Acid (ALA) as a Prodrug in Photodynamic Therapy of Cancer. *Molecules.* 2011;16(5):4140–64.
9. Prado Figueroa M, Santiago J. Intracellular localization of a long alkyl chain tetraphenylporphyrin and chloride channel activation in Psammobatis extenta electrocytes. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004; 3, 33–35.
10. Prado Figueroa M, Santiago J, SEM-EDS probing of morphological and physiological changes produced by a porphyrin photosensitizer in Psammobatis extenta electrocytes. *Micron.* 2007; 38(6), 668-73.
11. Baek S, Na K. A nano complex of hydrophilic phthalocyanine and polyethylenimine for improved cellular internalization efficiency and phototoxicity, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2013; 101, 493– 500.
12. Ortiz B, Lui H. Methyl Aminolevulinate-PDT for Actinic Keratoses and Superficial Nonmelanoma Skin Cancers, *Skin Therapy Letter.* 2009; 14(6), 1-3.
13. Gmurek M, Foszpanczyk M, Olak-Kucharczyk M, Gryglik D, Ledakowicz S. Photosensitive chitosan for visible-light water pollutant degradation, *Chemical Engineering Journal,* 2017; 318, 240-246.
14. Bonnett R, Krysteva M, Lalov I, Artarsky S. Water disinfection using photosensitizers immobilized on chitosan, *Water Res.* 2006; 40(6), 1269-1275.
15. Man T. Lasers and light sources for PDT: past, present and future, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2004; 1, 43-48.
16. Juzenas P, Juzeniene A, Kaalhus O, Lani V, Moan J. Noninvasive fluorescence excitation spectroscopy during application of 5-aminolevulinic acid in vivo, *Photochem. Photobiol. Sci.,* 2002; 1, 745-748.
17. Boubacar P, Sarrhini O, Lecomte R, van Lier J, Bentourkia M. A real-time follow-up of photodynamic therapy during PET imaging, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2015; 12, 428-435.
18. Peña-Rodríguez E, García-Berrocoso T, Vázquez Fernández E, Otero-Espinar F, Abian J, Fernández-Campos F. Monitoring dexamethasone skin biodistribution with ex vivo MALDI-TOF mass spectrometry imaging and confocal Raman microscopy, *International Journal of Pharmaceutics,* 2023; 636, 122808.
19. Didamson OC, Chandran R and Abrahamse H. Aluminium phthalocyanine-mediated photodynamic therapy induces ATM-related DNA damage response and apoptosis in human oesophageal cancer cells. *Front. Oncol.* 2024, 14:1338802. doi: 10.3389/fonc.2024.1338802.
20. Roach, J. A. G., Musser, S. M., Morehouse, K., & Woo, J. Y. J. Determination of Usnic Acid in Lichen Toxic to Elk by Liquid Chromatography with Ultraviolet and Tandem Mass Spectrometry Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 2006; 54(7), 2484-2490.
21. Boehm F, Clarke K, Edge R, Fernandez E, Navaratnam S, Quilhot W, Rancan F, Truscott T. Lichens - Photophysical studies of potential new sunscreens, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology,* 2009; 95(1), 40-45.

22. Murotomi, K.; Umeno, A.; Shichiri, M.; Tanito, M.; Yoshida, Y. Significance of Singlet Oxygen Molecule in Pathologies. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 2739. <https://doi.org/10.3390/ijms24032739>
23. Beton-Mysur K, Jarota A, Wolszczak M, Brozek-Pluska B. Spectroscopic Insights into the Localization and Photodynamic Efficacy of Aluminum Tetrasulfonated Phthalocyanine for Colorectal Cancer Therapy. *J Phys Chem B.* 2025; 129(33), 8265-8280.